



TESIS DE DOCTORADO

VALOR DIAGNÓSTICO DEL PERFIL MINERAL EN EL PERRO

Yolanda Cedeño Prócel

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD VETERINARIA

LUGO

2020



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Valor diagnóstico del perfil mineral en el perro

Dña. Yolanda Cedeño Prócel

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Quito -Ecuador-, 27 de julio de 2020

Fdo. Yolanda Cedeño Prócel



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Valor diagnóstico del perfil mineral en el perro

Dña. Marta I. Miranda Castañón, Profesora Titular del Departamento de Anatomía, Producción Animal y Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidade de Santiago de Compostela y Dña. M. Marta López Alonso, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal de la Universidade de Santiago de Compostela

INFORMA/N:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Yolanda Cedeño Prócel**, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directoras de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Lugo, 27 de julio de 2020

Fdo. Marta I Miranda Castañón

Fdo. M Marta López Alonso



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS CONFLICTO DE INTERESES

Valor diagnóstico del perfil mineral en el perro

Dña. Yolanda Cedeño Prócel

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) No tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral*

En Quito -Ecuador-, 13 de octubre de 2020

Fdo. Yolanda Cedeño Prócel

Poder viajar a un país como España con el objetivo de hacer una maestría fue muy emocionante para mí y no imaginé estar ahora escribiendo estas palabras para mi tesis doctoral; por eso quiero expresar mi profundo agradecimiento a las personas que me dieron esta oportunidad, mis tutoras Marta López-Alonzo y Marta Miranda Castañón. Gracias por su guía y sus enseñanzas durante estos años, por su calidez conmigo y mi familia, porque me siento afortunada de haber trabajado junto a ustedes y porque la oportunidad que me brindaron me ha abierto muchas puertas en mi país; gracias por sus valiosos consejos y sobre todo por su amistad.

Al Servicio de Medicina Interna del Hospital Veterinario Universitario Rof-Codina donde se muestrearon numerosos pacientes que pasaron a formar parte de esta Tesis Doctoral.

A Maruska Suarez y Carlos Herrero, por su guía y colaboración para la realización de este trabajo.

A Ruth Rodríguez Bermúdez e Inma Orjales, por su compañerismo y ayuda en el laboratorio y por compartir esas conversaciones siempre interesantes. Inma fue mi gran colaboradora en la selección y muestreo de los pacientes.

Al Dr. Germán Santamarina, Decano de la Facultad de Veterinaria, y a al resto de profesores del Hospital Veterinario Universitario Rof Codina con los que tuve la oportunidad de trabajar: Antonio Cantalapiedra, Maruska, Ana Goicoa, Luciano Espino, Ángela González, Lucas Rigueira, Daniel Barreiro y Luis Fidalgo, por permitirme realizar las estancias en el hospital y su disposición de compartir sus conocimientos.

A los profesores del departamento de Patología Animal: Víctor Pereira, José Luis Benedito, Joaquín Hernández y Cristina Castillo, por su amabilidad y cordialidad que siempre me hicieron sentir como en casa.

Mi agradecimiento a Verónica Piñeiro por su trabajo para el procesamiento de las muestras.

Quiero agradecer especialmente a mis padres y hermanos por su amor y apoyo incondicional; a mi esposo Diego, mi compañero en esta aventura y a mis hijos Martina y Daniel que son el motor de mi vida.

También quiero agradecer a la Universidad Central del Ecuador que me ha permitido realizar los estudios de doctorado y en donde he aprendido la responsabilidad, compromiso y esfuerzo que representa la docencia universitaria.



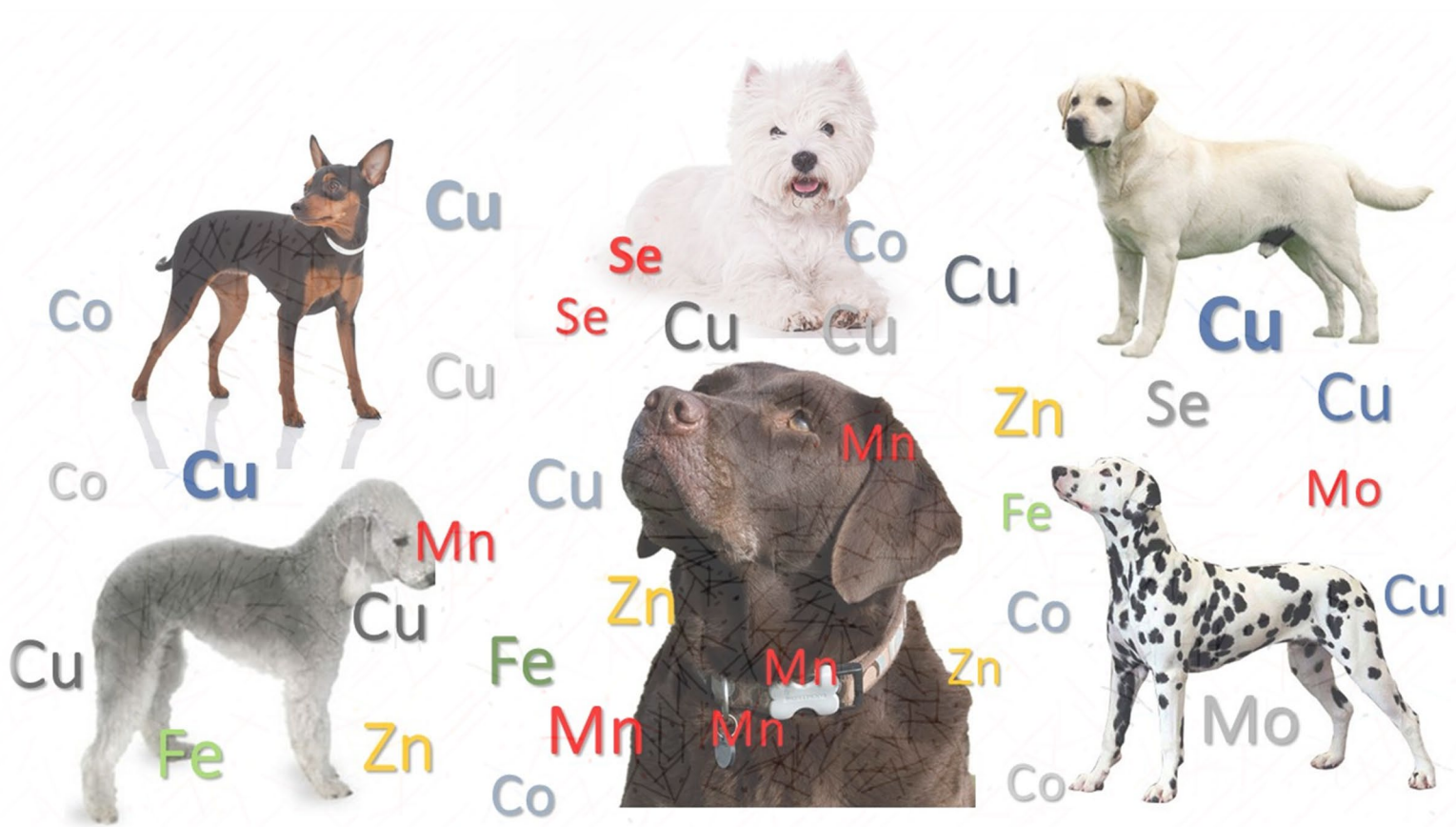
ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
RESUMEN/SUMMARY/RESUMO	1
INTRODUCCIÓN	7
1. ELEMENTOS ESENCIALES	10
1.1. Cobalto	10
1.2. Cobre	12
1.3. Cromo	16
1.4. Hierro	17
1.5. Manganeseo	19
1.6. Molibdeno	21
1.7. Selenio	22
1.8. Zinc	24
2. METALES TÓXICOS	26
2.1. Arsénico	27
2.2. Cadmio	28
2.3. Mercurio	29
2.4. Plomo	30
3. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS ESENCIALES EN SUERO	32
4. VARIACIÓN DE ELEMENTOS ESENCIALES EN SUERO EN DIFERENTES PROCESOS PATOLÓGICOS	34
4.1. Enfermedades inflamatorias	34
4.2. Anemia por inflamación crónica	35
4.3. Enfermedad renal	36
4.4. Enfermedades oncológicas	37
5. ENFERMEDAD HEPÁTICA CANINA ASOCIADA AL COBRE	40
5.1. Introducción	40

	Pág.
5.2. Cu y daño hepático	40
5.3. Signos clínicos	43
5.4. Diagnóstico	44
5.5. Tratamiento	47
5.6. El perro como modelo de intoxicación por Cu	50
6. MINERALES EN ALIMENTO COMERCIAL PARA PERROS	51
6.1. Variaciones en los requerimientos nutricionales	55
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
OBJETIVOS	73
RESULTADOS y DISCUSIÓN: CAPÍTULOS	
Capítulo 1. Concentración sérica de elementos esenciales y tóxicos en perros sanos y con diversas patologías	79
Capítulo 2. Niveles de oligoelementos en suero: una valiosa herramienta de diagnóstico en perros	99
Capítulo 3. Concentración de cobre y otros elementos esenciales y tóxicos en perros con hepatitis crónica	119
CONCLUSIONES	135
ANEXOS (Publicaciones)	139
Publicación 1. Serum Concentrations of Essential Trace and Toxic Elements in Healthy and Disease-Affected Dogs. <i>Animals</i> 10 (7), 1052; doi:10.3390/ani10061052.	143
Publicación 2. Trace element levels in serum: a valuable diagnosis tool in dogs. <i>Animals</i> . Submitted	157
Publicación 3. Hepatic concentrations of copper and other metals in dogs with and without chronic hepatitis. <i>Journal of Small Animal Practice</i> . 57(12): 703-709. 2016. DOI: 10.1111/jsap.12591	173



RESUMEN SUMMARY RESUMO



RESUMEN

Los micronutrientes, incluyendo elementos traza, tienen un rol vital en los continuos procesos regenerativos, en contrarrestar el estrés oxidativo y en mantener la inmunidad. Los defectos en el metabolismo del cobre han sido descritos en varias razas de perros, los cambios en otros elementos esenciales también podrían estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad hepática y de otras enfermedades.

Este estudio fue diseñado para (i) establecer intervalos de referencia para elementos esenciales en una población de perros sanos y evaluar el nivel de exposición a elementos tóxicos; (ii) evaluar si las concentraciones de elementos esenciales varían en animales con diferentes patologías; (iii) evaluar la relación de las concentraciones de elementos esenciales con parámetros bioquímicos en relación con la patología subyacente, y (iv) evaluar los niveles hepáticos de cobre y sus interacciones con otros elementos esenciales y tóxicos en perros diagnosticados con hepatitis crónica. Para los objetivos (i), (ii), y (iii) se recogieron muestras de sangre de 187 perros, incluyendo animales enfermos y sanos. Para el objetivo (iv) se tomaron 20 muestras de hígado de perros con hepatitis crónica y 20 muestras de animales sanos. Se determinaron las concentraciones de elementos esenciales (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) y tóxicos (As, Cd, Hg, Pb) mediante espectrometría de masa con fuente de plasma acoplado (ICP-MS).

Este estudio, ha permitido establecer rangos de referencia para elementos esenciales y el nivel de exposición a elementos tóxicos en perros e identificar varias alteraciones clínicas asociadas con variaciones séricas de elementos traza y de parámetros hematológicos y marcadores bioquímicos. Nuestros resultados indican que, la determinación de elementos traza en suero, puede aportar información útil en la patogenia de ciertas enfermedades (como causa o consecuencia). La investigación sobre la concentración de elementos esenciales en suero, particularmente, en conexión con otros parámetros bioquímicos y herramientas diagnósticas, ofrece información importante en el diagnóstico y pronóstico de diferentes enfermedades. Los perros con hepatitis crónica además de tener incrementados los niveles de cobre en hígado presentan también niveles superiores de cobalto, manganeso y zinc; la determinación de estos elementos podría contribuir en el diagnóstico de enfermedad hepática en perros.

Palabras clave: perro, elementos traza, metales tóxicos, suero, hígado, ICP-MS

SUMMARY

Micronutrients, including trace elements, play a vital role in regenerative processes, the responses to oxidative stress in the body tissues and sustaining immunity. Defects in copper metabolism have been described in several dog breeds, and recently, it has been suggested that changes in other essential trace elements could be involved in the pathogenesis of hepatic and other diseases.

This study was designed (i) to establish reference ranges for essential trace element and background levels of toxic element exposure in the healthy/normal dog population; (ii) to evaluate whether trace element concentrations vary in dogs suffering from different pathologies; (iii) to evaluate the relationship between trace elements and biochemical biomarkers in different diseases, and (iv) to evaluate hepatic copper accumulation and its interactions with other essential trace and toxic metals in dogs diagnosed with chronic hepatitis. For objectives (i) to (iii) blood samples were collected from 187 healthy and diseased dogs. For objective (iv) liver samples of 20 chronic hepatitis and 20 healthy dogs were collected. The concentrations of trace elements (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn) and toxic elements (As, Cd, Hg and Pb) were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).

The study enabled us to establish reference ranges for the essential trace elements and the level of toxic element exposure in dogs, and to identify several clinical situations associated with variations in trace elements in serum and hematology and biochemical biomarkers. Trace element concentrations can be a cause or consequence of disease, and the study findings indicate that trace element determination in serum provides useful information on the pathogenesis of certain diseases. Serum concentrations of trace elements, particularly in relation to other biochemical parameters and diagnostic tools, may provide valuable information for the diagnosis of diseases in dogs and the disease prognosis. Dogs with chronic hepatitis not only have increased concentrations of copper in the liver but also increased concentrations of cobalt, manganese and zinc; measurement of these elements may perhaps aid in diagnosis of liver disease in dogs.

Key words: dog, trace elements, toxic metals, serum, liver, ICP-MS

RESUMO

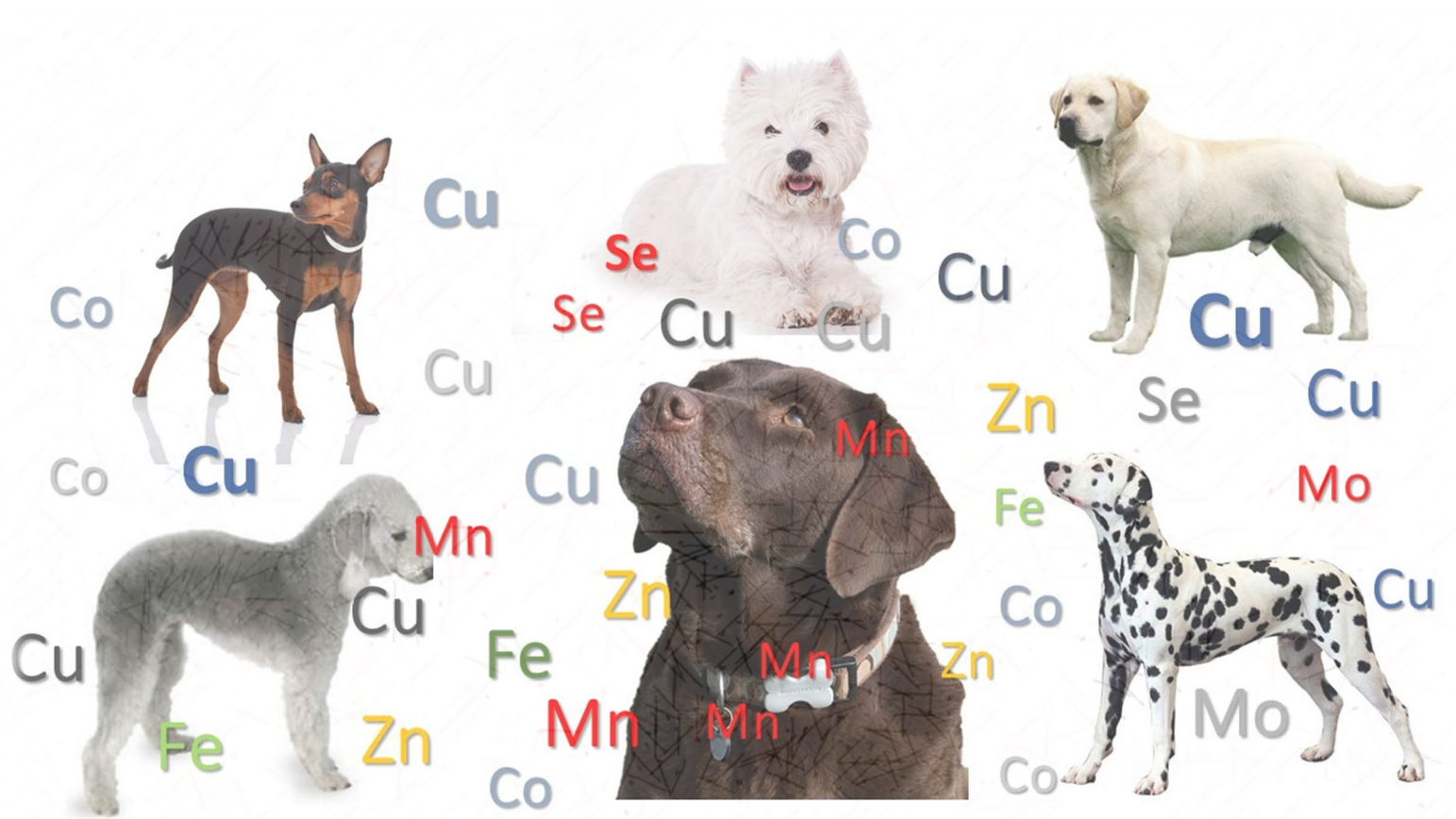
Os micronutrientes, incluíndo elementos traza, teñen un rol vital nos continuos procesos rexenerativos, en contrarrestar o estrés oxidativo e en manter a inmunidade. Os defectos no metabolismo do cobre foron descritos en varias razas de cans, os cambios noutros elementos esenciais tamén poderían estar involucrados na patoxénese da enfermidade hepática e doutras enfermidades.

Este estudo foi deseñado para (i) establecer intervalos de referencia para elementos esenciais nunha poboación de cans sans e avaliar o nivel de exposición a elementos tóxicos; (ii) avaliar si as concentracións de elementos esenciais varían en animais con diferentes patoloxías; (iii) avaliar a relación das concentracións de elementos esenciais con parámetros bioquímicos en relación coa patoloxía subxacente, e (iv) avaliar os niveis hepáticos de cobre e as súas interaccións con outros elementos esenciais e tóxicos en cans diagnosticados con hepatite crónica. Para os obxectivos (i), (ii), e (iii) recolléronse mostras de sangue de 187 cans, incluíndo animais enfermos e sans. Para o obxectivo (iv) tomáronse 20 mostras de fígado de cans con hepatite crónica e 20 mostras de animais sans. Determináronse as concentracións de elementos esenciais (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Nin, Se, Zn) e tóxicos (As, Cd, Hg, Pb) mediante espectrometría de masa con fonte de plasma axustado (ICP-MS).

Este estudo permitiu establecer rangos de referencia para elementos esenciais e o nivel de exposición a elementos tóxicos en cans e identificar varias alteracións clínicas asociadas con variacións séricas de elementos traza e de parámetros hematolóxicos e bioquímicos. Os nosos resultados indican que, a determinación de elementos traza en soro, pode aportar información útil na patoxenia de certas enfermidades (como causa ou consecuencia). A investigación sobre a concentración de elementos esenciais en soro, particularmente, en conexión con outros parámetros bioquímicos e ferramentas diagnósticas, ofrece información importante no diagnóstico e pronóstico de diferentes enfermidades. Os cans con hepatite crónica ademais de ter incrementados os niveis de cobre en fígado presentan tamén niveis superiores de cobalto, manganeso e zinc; a determinación destes oligoelementos podería contribuír no diagnóstico da enfermidade hepática en cans.

Palabras clave: can, elementos traza, metais tóxicos, soro, fígado, ICP-MS

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

Los minerales cumplen funciones biológicas de gran importancia en diversos procesos biológicos como crecimiento y desarrollo óseo, reproducción, inmunocompetencia, protección antioxidante, función cognitiva y metabolismo cerebral. El estudio del metabolismo mineral y sus alteraciones son un tema en constante desarrollo (Clarkson, 1995; Soetan et al., 2010). Existe información extensa sobre los desequilibrios del metabolismo mineral y sus consecuencias clínicas en medicina humana (Collins, 2016). En veterinaria, gran parte de la investigación existente proviene de animales de producción en donde son comunes las alteraciones reproductivas o en los parámetros de producción, por deficiencias nutricionales o suplementación inapropiada (Suttle, 2010).

La información sobre el balance mineral y la presentación de enfermedades en perros es menor. En esta especie es menos común la presentación clínica de deficiencias debido al consumo de dietas comerciales, balanceadas, que aportan los nutrientes necesarios para cada etapa de la vida. Sin embargo, se han descrito algunas patologías asociadas a desequilibrio de microminerales en perros; algunas de base genética como la hepatitis crónica por acumulación de cobre (Cu) (Favier et al., 2012; Webster et al., 2019), la acrodermatitis letal (Bull terrier) o la dermatosis que responde a zinc (Zn) (Hardy, 2016); otras asociadas a la nutrición, derivadas de desequilibrios en la dieta o exceso en la suplementación (Kelly et al., 2013), las cuales son poco comunes en la práctica general; y también están las alteraciones del metabolismo mineral producidas por enfermedades crónicas, como es el caso de la enfermedad renal (Alborough et al., 2020), hepática (Favier et al., 2011; Cedeño et al., 2016; Webster et al., 2019) o enfermedades oncológicas (Dash et al., 2018; Harro et al., 2019), que han sido menos estudiadas en perros.

La determinación del estatus mineral en un animal es, en muchos casos difícil, debido a la complejidad de su metabolismo, absorción, almacenamiento y excreción. Existen biomarcadores de estatus para cada elemento (Dirksen et al., 2016), con utilidad variable, que pueden ser de difícil acceso para el clínico general.

También, el diagnóstico de las alteraciones derivadas de deficiencias o excesos de microminerales puede ser complicado, los signos clínicos suelen ser inespecíficos (anorexia, pérdida de peso, alteraciones del pelaje) y pueden requerir de métodos de diagnóstico invasivos como la realización de biopsias (Schultheiss et al., 2002).

Existen elementos catalogados como esenciales en perros que deben ser ingeridos en la dieta: cobalto (Co), Cu, cromo (Cr), yodo (I), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), selenio (Se) y Zn; los cuales cumplen con funciones metabólicas conocidas e importantes para el mantenimiento de la salud. Otros elementos son considerados como probablemente esenciales debido a que mejoran ciertos parámetros biológicos como la ganancia de peso o el crecimiento, pero sus funciones específicas no están completamente especificadas como: boro (B), níquel (Ni) y vanadio (V) y existen también los elementos catalogados como tóxicos, los cuales son perjudiciales para el organismo incluso a niveles muy bajos, entre estos están el arsénico(As), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) (Clarkson, 1995; NRC, 2005, 2006).

1. ELEMENTOS ESENCIALES

1.1. Cobalto

Las funciones y alteraciones del Co y su metabolismo en animales están descritas en función de su estrecha relación con la cobalamina (vitamina B12).

1.1.1. Funciones biológicas y metabolismo

Existe muy poca información sobre el metabolismo del Co en perros que no esté asociado a esta vitamina(NRC, 2005, 2006). Tampoco existen datos sobre el requerimiento nutricional de Co como nutriente ya que se describe el requerimiento de vitamina B12 como tal, debido a que en tejidos animales no se da la síntesis de cobalamina a partir de Co y esta debe ser ingerida por el animal como vitamina B12 (NRC, 2006). En perros, las bacterias intestinales pueden sintetizar cobalamina a partir de Co, sin embargo el sitio de síntesis es caudal al sitio de absorción que es la región posterior del intestino delgado (íleon) (Kather et al., 2020).

La información sobre los valores séricos de Co en perros es escasa y no existen rangos de referencia. Algunos estudios describen valores séricos utilizando grupos de animales sanos como control. Los valores reportados son muy dispares, cuando se utilizan técnicas de medición como la absorción atómica, los niveles son muy altos: 24 µg/L (Mert et al., 2008); 36 µg/L (Dash et al., 2018), mientras que con técnicas analíticas más sensibles, como espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS), con bajos límites de

detección los niveles son casi cien veces menores: 0.30 µg/L (Vitale et al., 2019), y se ajustan más a la realidad actual si lo comparamos con rangos descritos en humana (Forrer et al., 2001) o en especies de abasto (Herdt and Hoff, 2011; Luna et al., 2019) determinados por esta técnica analítica.

Para los valores de vitamina B12 en perros, los rangos de referencia están entre 215 a 500 ng/L y junto con los niveles séricos de ácido metilmalónico (AMM) y homocisteína representan un buen indicador del estatus de cobalamina en un animal a nivel celular (Kather et al., 2020).

El mecanismo de absorción de cobalamina en perros es complejo. Es necesario la presencia de un factor intrínseco que en el perro se genera a nivel pancreático y en menor proporción a nivel gástrico. El complejo cobalamina-factor intrínseco se absorbe en el íleon a través de un receptor específico localizado en la membrana del enterocito a este nivel.

En perros, la deficiencia nutricional de cobalamina es poco común ya que los alimentos comerciales son fortificados con este nutriente, sin embargo en ciertos casos, cuando los animales son alimentados con dietas de origen vegetal puede existir una potencial deficiencia ya que las fuentes principales son de origen animal (NRC, 2006).

1.1.2. Alteraciones del metabolismo del Co en perros

Las causas comunes de deficiencia de vitamina B12 son secundarias a enfermedades como inflamación crónica o neoplasias intestinales, insuficiencia pancreática exocrina, disbiosis intestinal o diarrea que responde a antibióticos. De hecho, esta vitamina, junto con la vitamina B9 o ácido fólico se usa rutinariamente en clínica como marcador diagnóstico de enfermedad digestiva. También, su deficiencia, puede ser debida a alteraciones genéticas en los mecanismos de absorción. Estas enfermedades han sido descritas en razas como el Border collie y el Schnauzer gigante (Fyfe et al., 2013) además de otras razas puras y mixtas. En estos animales, los niveles séricos de cobalamina son menores a 100 ng/L (Dandrieux et al., 2013).

La cobalamina actúa como cofactor esencial de las enzimas metionina sintetasa y metilmalonilCoA mutasa, esta última cataliza la formación de succinilCoA; factor clave en el ciclo del ácido cítrico. La deficiencia de cobalamina produce la elevación de AMM en suero y orina. Esta acumulación altera también el ciclo de la urea, produciendo elevación de amoníaco y alteraciones neurológicas en perros (Battersby et al., 2005).

Otra consecuencia de deficiencia de cobalamina es la hiperhomocisteinemia. La homocisteína es un producto del metabolismo de la metionina y necesita la presencia de metionina sintasa como cofactor para degradarse, en perros con deficiencia de cobalamina, ácido fólico o piridoxina sus niveles se incrementan. Esta condición ha sido asociada con

alteraciones vasculares como arteroesclerosis y enfermedad de Alzheimer en humanos y se ha encontrado elevada en perros con enfermedad cardíaca, renal e hipotiroidismo (Kather et al., 2020).

Entre las características clínicas en perros con deficiencia de cobalamina se presentan: anemia no regenerativa con megaloblastosis, neutropenia con hipersegmentación, falta de desarrollo, y en casos más severos anorexia, letargia, vómito y diarrea; en la mayoría de animales se presenta en etapas juveniles y en animales con alteraciones genéticas, entre las 6 y 12 semanas de edad (Fyfe et al., 1991).

Las pautas de tratamiento descritas son la administración subcutánea de 50 µg/kg de cianocobalamina por un período de 6 semanas, con una dosis adicional un mes después y realizar un monitoreo de los niveles de cobalamina después de este período, si se resuelve la enfermedad subyacente, los niveles de cobalamina deberían estar sobre el nivel mínimo a las 4 semanas (Toresson et al., 2019).

1.2. Cobre

El Cu es un elemento esencial que tiene importantes funciones en varios procesos celulares (Linder and Hazegh-Azam, 1996). La identificación de su rol fisiológico en seres vivos fue descrita en 1927, en la resolución de anemia en ratas (Cohn et al., 1927). Perteneció a la primera serie de metales de transición igual que el Zn, Mn, Co, Fe y Cr. Se puede encontrar en dos estados en el organismo, como ion cúprico, estable Cu^{+2} , o como ion cuproso, inestable Cu^{+1} , por lo que puede donar y recibir electrones (Hoffmann, 2009).

Las cantidades estimadas de Cu en perros son pequeñas, entre 3.8 y 7.3 mg/kg PC⁻¹ en cachorros neonatos y adultos jóvenes (Meyer, 1984). De estas un tercio se encuentran en hígado, cerebro, corazón y pelo (>5 µg/g). Los tejidos con contenido medio de Cu (1.5-5 µg/g) son riñón, páncreas, piel, músculo y hueso. Y los tejidos con contenido bajo en cobre (< 1.5 µg/g) son la pituitaria, tiroides, timo, ovario y testículo (Keen et al; 2003).

1.2.1. Funciones biológicas y metabolismo

Es cofactor de enzimas que participan en reacciones de transferencia de electrones. También cumple funciones no enzimáticas, es componente estructural de proteínas transportadoras y moléculas antioxidantes (Thornburg, 2000).

- Ceruloplasmina (Cp): Contiene 6 a 7 átomos de Cu en su estructura; permite la oxidación del Fe para que pueda unirse a transferrina y ser movilizado a través de la membrana celular. En perros el Cu permanece unido a la Cp en el suero entre un 56 a 92% (Brewer, 2003), sin embargo esta proteína no actúa directamente en el

metabolismo del Cu, pero si en el de Fe. Es considerada como biomarcador útil de deficiencia de Cu en algunas especies animales.

- Hefaestina: es una proteína análoga de la Cp pero que se encuentra exclusivamente en la membrana de las células intestinales. Su función es la de absorción de Fe sobre todo en etapas tempranas de crecimiento y en la gestación, donde su expresión es mayor. Su expresión y actividad están reguladas por los niveles de Cu en el organismo (Bertinato and L'Abbé, 2004).
- Superóxido Dismutasas (SOD): Son proteínas con acción antioxidante, SOD1 se localiza a nivel intracelular y depende de Cu y Zn para su función. El Zn es un componente estructural y el Cu participa como catalizador (Vonk et al., 2010).
- Citocromo C oxidasa (CCO): Participa en la producción de ATP mitocondrial, contiene 3 iones de Cu necesarios para su función. El complejo CCO también está formado por magnesio (Mg) y Zn.
- Dopamina Beta monooxigenasa: Enzima dependiente de Cu que permite convertir la dopamina en norepinefrina (Vonk et al., 2008).
- Tirosinasa: Involucrada en la síntesis de melanina. En animales, la deficiencia de Cu produce despigmentación del pelaje y trastornos de la queratinización.
- Monoaminoxidasas: Involucrada en el catabolismo de catecolaminas.
- Lisil oxidasa: Actúa en la formación de tejido conectivo estabilizando las fibras de colágeno y elastina. La actividad de esta enzima se encuentra ligada a enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, y fibrosis, así como también a metástasis y progresión de tumores y es considerada un target terapéutico en estas enfermedades (Tapiero et al., 2003).

El Cu es absorbido en todas las porciones del tracto gastrointestinal, en perros la mayor parte de la absorción se da a través de la membrana apical del intestino delgado; entre el 30 y 60% del total de la ingesta (Thornburg, 2000).

El contenido de Cu en el alimento de perros es variable entre marcas, el nivel recomendado es de 2.08 mg/1000Kcal EM (Kastenmayer et al., 2002).

La absorción de Cu desde el lumen intestinal, está influenciada por varios factores, la edad, el estado fisiológico, factores nutricionales, solubilidad, entre otros. La entrada de Cu al enterocito, no garantiza su absorción, puede permanecer unido a metalotioneinas (MT) hasta ser eliminado por las heces cuando la célula intestinal es exfoliada, o ser transportado hacia la membrana basolateral para su paso a la circulación (Linder and Hazegh-Azam, 1996).

Tras su absorción, el Cu pasa a la circulación portal alrededor de 2 a 6 horas después. En el perro la concentración normal en suero es 0.4-0.8 µg/mL, es un tercio de las

concentraciones encontradas en seres humanos (Puls R, 1994).

En el transporte hacia el hígado está ligado a proteínas plasmáticas, a diferencia de otros animales, en el perro es la transcupreína la de mayor afinidad 80% y la albúmina transporta sólo un 20 %, la unión a estas proteínas es débil e inestable y representa la fracción de Cu intercambiable (Bremner and Beattie, 1995) La otra fracción de Cu en la circulación es la que está unida a la Cp. Esta unión es muy estable, no intercambiable pero disponible para la mayoría de tejidos (Montaser et al., 1992) En animales aceruloplasminémicos existe una disminución de la captación de Cu pero no completamente, lo que sugiere la capacidad de los tejidos de tomar el Cu de la fracción intercambiable. El transporte intracelular del Cu es muy similar en animales plantas, hongos y bacterias ya que comparten los mismos elementos transportadores (Harris, 2000). El hígado actúa como principal órgano de almacenamiento del Cu ya que recibe la mayor parte del Cu absorbido y de distribución de este mineral a otros tejidos del organismo unido a proteínas. Además es el órgano principal para su excreción (Klein et al., 1998). En el hepatocito, el Cu iónico es rápidamente captado por ligandos citosólicos de bajo peso molecular como MT y glutatión, y también por péptidos de alto peso molecular. Algunas de estas moléculas no solo actúan como almacenadores sino también como transportadores intermediarios para varias vías metabólicas (Camakaris et al., 1999). Puede incorporarse a la Cp y volver a la circulación para transporte hacia otros tejidos. Puede incorporarse a cuproenzimas en el citoplasma como SOD o CCO en la mitocondria o puede permanecer almacenado junto a MT en el hepatocito.

La principal vía de eliminación de Cu es la vía biliar. La eliminación de Cu desde el hepatocito es un proceso concentración dependiente, mediado por el transportador ATP7B. (Lutsenko et al., 2007). Al incrementarse las concentraciones de Cu, el transportador ATP7B sale del aparato de Golgi y se relocaliza en la membrana canalicular en vesículas, atrapando el Cu del citosol y movilizándolo hacia la bilis. La localización subcelular de ATP7B y la cantidad de vesículas es dependiente de la concentración de Cu (Nyasae et al., 2014).

1.2.2. Biomarcadores del estatus de Cu

Existen varios biomarcadores que han sido propuestos para identificar estados de exceso o deficiencia de Cu en varias especies animales, entre estas están:

Deficiencia de Cu

- La SOD como biomarcador del estatus de Cu. La SOD Cu/Zn es una proteína con acción antioxidante de localización intracelular y depende de Cu y Zn para su función y de su chaperon (CCS) para el transporte de Cu. La actividad de SOD en eritrocitos y de la proteína CCS han sido evaluadas como biomarcadores del estatus de Cu en varias especies con resultados variables. La actividad enzimática de SOD

en eritrocitos disminuye en estados de deficiencia de Cu y esto ha sido probado en roedores, vacas y seres humanos (Arredondo et al., 2014). La concentración de proteína CCS incrementa en roedores y en vacas en estados de deficiencia de Cu (de Romaña et al., 2011).

- Actividad de CCO en plaquetas: En roedores, la actividad de esta enzima disminuye en individuos que consumen dietas deficientes en Cu y también ha sido propuesta como indicador sensible a los cambios en la dieta (Bikker et al., 2014).
- Diamino Oxidasa plasmática: La actividad de esta enzima disminuye de forma paralela a la concentración hepática de Cu en ratones y en seres humanos que consumen dietas con niveles marginales o deficientes en Cu (DiDonato and Sarkar, 1997).

Exceso de Cu

- Entre los biomarcadores planteados para determinar un exceso o toxicidad por Cu estan la medición de Cu “libre” (representa el 10% del cobre sérico total), la Cp y la fracción no unida a la Cp en suero, que se considera un marcador biológico para la enfermedad de Wilson y para la determinación de exceso de Cu en seres humanos con enfermedad de Alzheimer. Hasta ahora la determinación de la concentración de Cu hepático es considerada la prueba de oro para determinación de toxicidad por Cu en varias especies, así como también para monitorización del tratamiento de la enfermedad hepática por exceso de Cu en perros (Whittemore et al., 2012; Webster et al., 2019).
- En seres humanos los niveles de Cu libre en suero mayores a 1.6 $\mu\text{mol/L}$ (101.6 $\mu\text{g/L}$) son diagnósticos para detección de enfermedad de Wilson y es considerada de valor pronóstico en casos de trastornos cognitivos en seres humanos ya que a mayor cantidad de Cu libre en suero mayor evidencia de trastorno cognitivo (Squitti et al., 2009). Los niveles de Cu libre también pueden incrementarse en fallo hepático agudo de cualquier etiología, enfermedades colestásicas y en casos de intoxicación por Cu.
- La SOD y su chaperon (CCS) para el transporte de Cu. En perros se evaluó la utilidad de la concentración de CCS Y SOD1 en eritrocitos, y el ratio CCS/SOD1. Se encontró que la CCS fue 2.37 veces más baja en animales con acumulación hepática de Cu que en perros sanos. El ratio CSS/SOD1 fue 3.2 veces menor. Por tanto podrían ser considerados como biomarcadores de acumulación de Cu en perros (Dirksen et al., 2016).

1.3. Cromo

Es un elemento esencial, presente en los tejidos animales en cantidades ultra traza, su esencialidad fue descrita en 1959, por producir reducción de la intolerancia a la glucosa en ratas. Tiempo después fue descrito como potenciador de la insulina (Striffler et al., 1995). El Cr en organismos vivos se encuentra principalmente con valencia (III) y (VI). El Cr trivalente cumple funciones fisiológicas y forma complejos estables con ligandos orgánicos e inorgánicos, mientras que el Cr hexavalente es altamente tóxico; proviene casi en su totalidad de actividades industriales y es reducido a valencia (III) en el ambiente; es considerado carcinógeno, alérgeno e irritante en personas y varias especies animales (Cohen et al., 1993).

1.3.1. Funciones biológicas y metabolismo

En perros no se ha descrito el requerimiento nutricional de este elemento, sin embargo, se ha establecido un límite máximo de 100 mg/kg MS en alimentos para mascotas. Varios estudios han determinado la concentración de Cr en dietas y los resultados son variables, con un promedio de 0.3 a 1.5 mg/kg materia seca (MS) (Duran et al., 2010; Kim et al., 2018a; Pereira et al., 2018). La biodisponibilidad es baja, aproximadamente un 2%, los compuestos orgánicos como el picolinato de Cr tienen mayor porcentaje de absorción. Es transportado en la circulación unido a transferrina (transportador de Fe), los órganos con mayor concentración son el hígado, el bazo y el riñón. Se excreta a través de la orina, en animales que consumen dietas altas en carbohidratos la excreción de Cr es mayor (Tirapegui, 2008).

1.3.2. Alteraciones del metabolismo del Cr en perros

Los signos de deficiencia reportados en animales, incluido el perro son: hiperglicemia, hipercolesterolemia, incremento de los niveles de triglicéridos y resistencia a la insulina (Iskra, 2010). Por otro lado el consumo excesivo de Cr puede reducir la tasa de crecimiento en animales jóvenes (Iskra and Antonyak, 2018). En perros suplementados con 200 a 800 µg/día de picolinato de Cr durante tres meses, no se encontraron alteraciones ni signos de toxicidad (Schachter et al., 2001).

Cromo y diabetes en perros

La diabetes mellitus es una enfermedad relativamente común en perros de mediana edad a adultos. Su etiología es multifactorial, en perros la causa más común es la destrucción autoinmune de islotes pancreáticos, existen razas con mayor predisposición como Caniche, Schnauzer, Bichon Frise, Pomeranian, Fox terrier. También puede ser secundaria a la administración de fármacos como glucocorticoides, o a determinadas patologías como el hiperadrenocortisismo, hipotiroidismo, obesidad, etc. Es clasificada en base a la respuesta a la insulina. Las causas primarias en perros son insulino dependientes mientras que en

casos secundarios suele ser no insulino dependiente; sin embargo en perros el tratamiento con insulina se instaura en todos los casos (Greco, 2018). De estudios en medicina humana se evidenció que la suplementación con Cr mejora la respuesta a la insulina en pacientes diabéticos (Appleton et al., 2002). En estos pacientes se evidencian alteraciones en el metabolismo del Cr como mayor excreción renal y también mayor absorción. En pacientes humanos con diabetes tipo 2 y pre diabéticos las concentraciones de cromo son menores a individuos sanos con valores de 3.68, 3.61 y 3.97 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (Chen et al., 2017).

La acción del Cr en el metabolismo de la glucosa se da con la formación de cromodulina; éste es un oligopéptido que junto al Cr amplifica la actividad del receptor tirosina kinasa e incrementa la acción de la insulina, sin Cr, la apocromodulina es inactiva (Vincent, 2018). En respuesta a la liberación de insulina el Cr es transportado hacia las células sensibles, a nivel intracelular se une a la apocromodulina y ejerce su acción permitiendo la entrada de glucosa; cuando bajan las concentraciones de insulina, la cromodulina es excretada en orina.

La suplementación con Cr en perros sanos ha generado respuestas variables sobre el metabolismo de la glucosa (Gross et al., 2000), lo mismo sucede con estudios realizados en perros diabéticos. Existen estudios sobre el uso de Cr orgánico como terapia adjunta al tratamiento con insulina con resultados variables. En un estudio con picolinato de Cr a una dosis de 20 a 60 Ug/kg/día no se encontraron diferencias significativas entre animales tratados o no (Schachter et al., 2001), mientras que con el uso de un complejo Cr-levadura (Cr bioactivo) 100 $\mu\text{g/día}$, el efecto en la reducción de la glucosa fue significativo. Las causas de la variabilidad de la respuesta no han sido dilucidadas, sin embargo puede deberse a factores como la dosis, la composición de la dieta de los animales, la forma de suplementación, las patologías concurrentes y el estatus previo de Cr de los animales, ya que el efecto benéfico es observado en mayor proporción en individuos con deficiencia (Muzik et al., 2011).

1.4. Hierro

El Fe es un elemento esencial perteneciente a la familia de metales de transición, es el de mayor abundancia en el organismo animal, un perro adulto tiene aproximadamente 100 mg de hierro por kilo de peso (Meyer, 1984). Aproximadamente el 70 % se encuentra unido a la hemoglobina, entre 3–5% está en el músculo como mioglobina y una pequeña parte en macrófagos (mieloperoxidasa), y en varias enzimas como citocromos, enzimas que sintetizan ADN y metalo-flavoproteínas. Puede existir en diferentes estados de oxidación, como Fe^{++} y Fe^{+++} , éste último es la forma más común. De esta capacidad, de recibir y donar

electrones derivan varias de sus funciones biológicas como catalizador enzimático, transporte de electrones y metabolismo oxidativo (McCown and Specht, 2011).

1.4.1. Funciones biológicas y metabolismo

El Fe es cofactor de las proteínas hemoglobina (transporte de oxígeno) y mioglobina (reserva de oxígeno a corto plazo). También participa como un “sensor” en condiciones de hipoxia, a través de la enzima prolil-hidroxilasa (dependiente de Fe) que regula las respuestas compensatorias en hipoxemia como la eritropoyesis, angiogénesis y glicólisis. Como componente del citocromo, participa en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria para generación de ATP (Hentze et al., 2010).

También cumple un rol muy importante en la producción de especies reactivas del oxígeno para la destrucción de patógenos en los leucocitos ya que es componente de la enzima mieloperoxidasa (Neumann, 2003). Además, el Fe participa como componente de enzimas que protegen a los tejidos contra daños oxidativos como catalasas, peroxidasas y el citocromo p450 involucrado además en el metabolismo de lípidos y fármacos en el citosol hepático (Saito, 2014).

En los alimentos balanceados, el Fe está presente en forma orgánica e inorgánica. La mayor parte del Fe orgánico en la dieta está unido a proteínas del grupo hemo y no-hemo, las cuales liberan Fe por acción enzimática de las secreciones gástrica y pancreática. Muchos ingredientes usados en la elaboración de alimento balanceado para perros son ricos en Fe y en algunos casos puede ser adicionado como suplemento (fosfato dicálcico, sulfato ferroso heptahidratado son los más comunes) (NRC, 2006). La absorción intestinal de Fe es diferente dependiendo de si es una fuente orgánica o inorgánica. La absorción de Fe inorgánico es inversamente proporcional al estatus de Fe del animal, y varía de acuerdo con la composición de la dieta pudiendo ir de un 90% a valores menores al 10%. La biodisponibilidad del Fe orgánico es mayor, aproximadamente de un 15 a un 20%, ya que presenta menos interacciones con componentes de la dieta como el nivel de calcio (Ca). En dietas comerciales la biodisponibilidad aparente puede ir entre un 8 a 30% dependiendo del estado fisiológico del animal (Fly and Czarnecki-Maulden, 2000). Además de los factores dietéticos, la absorción de Fe está regulada por la cantidad de Fe en la circulación y la demanda eritropoyética.

Se almacena en hígado como ferritina (Fe intercambiable) o hemosiderina (no intercambiable), puede acumularse en el sistema reticuloendotelial, hígado, bazo, páncreas y miocardio (McCown and Specht, 2011). No se ha descrito un mecanismo de eliminación de Fe del organismo y el principal mecanismo de regulación del estatus es a través de su absorción o retención en el tracto digestivo (Wheby and Spyker, 1981).

1.4.2. Alteraciones del metabolismo del Fe en el perro

La deficiencia de Fe en perros puede resultar de una ingesta inadecuada, que puede ocurrir en cachorros lactantes por los bajos niveles de Fe en la leche materna o en animales jóvenes que ingieren dietas mal balanceadas, actualmente estos problemas son poco comunes. Las pérdidas crónicas de sangre producidas en el tracto digestivo como consecuencia de neoplasias, úlceras, inflamación o parasitosis internas o externas pueden producir deficiencia de Fe y anemia en perros (McCown and Specht, 2011).

La anemia se presenta en estados crónicos de deficiencia y se caracteriza por sus bajos niveles de hemoglobina (anemia microcítica e hipocrómica) y por ser altamente regenerativa con bajos niveles de Fe sérico y saturación de transferrina. El desarrollo de pica es un trastorno alimentario que se presenta en animales con deficiencia de Fe (Chikazawa et al., 2013).

Por otro lado, dentro de las alteraciones por acumulación de Fe están la hemosiderosis y la hemocromatosis.

- La hemosiderosis se caracteriza por depósito de Fe en los tejidos sin producir daño orgánico ni signos clínicos. Se puede producir cuando el animal tiene ingesta muy elevada de Fe, y este se acumula en hígado y bazo, sin daños celulares asociados. Los procesos hemolíticos, los hematomas o las hemorragias intracavitarias pueden provocar hemosiderosis, en estos casos el Fe se almacena como hemosiderina.
- En la hemocromatosis existe una acumulación de Fe unido a ferritina en los hepatocitos y es secundario a un daño celular. En perros se han descrito casos por transfusiones repetidas (Sprague et al., 2003), o por deficiencia de la enzima piruvato kinasa en el Basenji que produce alteraciones hemolíticas (Whitney et al., 1994). De forma experimental se ha inducido hemocromatosis con cirrosis hepática en perros a los que se les administró Fe en altas dosis (5.8 g/kg IV) durante largos periodos de tiempo (10 meses) (Lisboa, 1971).

1.5. Manganeso

El Mn es un elemento esencial que en tejidos animales se encuentra en valencias +2 y +3.

1.5.1. Funciones biológicas y metabolismo

Es componente de varias enzimas y cumple roles de gran importancia en procesos como gluconeogénesis (piruvato carboxilasa), ciclo de Krebs (isocitrato dehidrogenasa), protección antioxidante mitocondrial (Mn SOD). Interviene en la síntesis de ácido hialurónico, sulfato de condroitina, melanina, dopamina, heparina; también es importante

en la actividad de osteoblastos y osteoclastos, mineralización ósea y formación de colágeno (Avila et al., 2013).

Los tejidos con mayor concentración de Mn son glándula pineal, glándula pituitaria, glándula mamaria, hígado y hueso. Se estima que el contenido total en perros es de 3 a 5mg. La ingesta adecuada es de 1.44 mg/1000 Kcal en perros adultos. En alimentos comerciales es añadido como carbonato, sulfato o cloruro de manganeso. Sus fuentes naturales son los cereales y granos principalmente (FEDIAF, 2012).

La biodisponibilidad en alimentos comerciales está estimada en un 10%, la presencia de altas cantidades de Ca, Fe y fitatos disminuyen su absorción (Grases et al., 2001).

1.5.2. Alteraciones del metabolismo del Mn en perros

No se han descrito cuadros de deficiencia en perros, este elemento, puede ser remplazado en algunas reacciones por Fe, Mg y Cu. En otras especies como pollos, ovejas y vacas en crecimiento la deficiencia de Mn produce alteraciones óseas y articulares (Suttle, 2010). La deficiencia en seres humanos es poco común y se describen signos como dermatitis e incremento de los valores séricos de Ca, fósforo (P) y fosfatasa alcalina (Smith et al., 2007).

La toxicidad por Mn no se ha descrito en perros de forma primaria. Su equilibrio en el organismo es altamente regulado a nivel gastrointestinal, la biodisponibilidad en general es baja y una parte de la ingesta es excretada por las heces sin ser absorbida. De forma secundaria se han encontrado incrementos de los niveles séricos y acumulación a nivel del sistema nervioso central (SNC) en perros con enfermedades hepáticas (Kilpatrick et al., 2014), shunt portosistémico (Gow et al., 2010) y epilepsia genética (Vitale et al., 2019). El Mn es excretado principalmente a través de la bilis y tiene un rol en el ciclo del ácido úrico; específicamente, forma parte de la enzima arginasa (Estévez et al., 2006), que participa en la eliminación de amonio del organismo transformándolo en urea en perros. En seres humanos con hepatitis aguda y cirrosis hepática también se produce un incremento de los valores séricos de Mn y acumulación cerebral (Keen and Zidenberg-Cherr, 1994).

El Mn se transporta unido a transferrina (transportador de Fe), y en cuadros de deficiencia de Fe, se ven incrementados los signos de toxicidad por Mn y su acumulación en el SNC (Ferreira et al., 2017).

1.6. Molibdeno

Es un elemento perteneciente a los metales de transición, con propiedades similares a las del Cr.

1.6.1. Funciones biológicas y metabolismo

Es un elemento esencial que funciona como cofactor de tres enzimas descritas en animales, la xantina oxidasa, la aldehído oxidasa y la sulfito oxidasa. Se integra a éstas en forma de molibdopterina. Interviene en procesos de catabolismo de purinas y formación de ácido úrico, catabolismo de aminoácidos azufrados, e interviene en reacciones de óxido-reducción (Barceloux and Barceloux, 1999).

La información acerca del metabolismo de Mo en perros es escasa. A pesar de ser un elemento esencial, no se han establecido los requerimientos en esta especie, en otras especies, los requerimientos son muy bajos. Se asume que los ingredientes usados en la fabricación de piensos contienen suficientes cantidades de este elemento y no se añade como aditivo. Tampoco se han descrito casos clínicos derivados de desequilibrios en el metabolismo de este elemento (NRC, 2006).

1.6.2. Alteraciones del metabolismo del Mo en perros

Los signos clínicos asociados a toxicosis han sido reportados en rumiantes y debido a que es un antagonista del Cu, los signos clínicos en estos casos asemejan a los de deficiencia de Cu: diarrea, anemia, alteraciones capilares, deformidades óseas y articulares, fallos en la reproducción, etc. (Suttle, 2010).

El Mo es antagonista del Cu y en perros, el tetratiomolibdato es usado como tratamiento quelante de Cu en la hepatopatía con acumulación de Cu (Langlois, 2015), ya que incrementa su movilización hepática y excreción renal (Komatsu et al., 2000).

La biodisponibilidad del Mo es alta en monogástricos; como ión hexavalente es absorbido en el estómago e intestino delgado (Kośla et al., 2019). Debido a la escasa regulación de la absorción intestinal, su metabolismo está regulado principalmente por la excreción urinaria, en donde existe competencia por los transportadores con el sulfato. En condiciones de ingesta elevada, los excesos son eliminados rápidamente a través de la orina (Hays et al., 2016).

Los valores séricos son altamente afectados por la ingesta y tienen buena correlación con la actividad biológica de sus enzimas (Turnlund and Keyes, 2004). En seres humanos, los valores de referencia establecidos son de 0.3-2 µg/L. En perros los datos son muy escasos, pero en algunos estudios se reportan niveles séricos de 8.45 µg/L (Vitale et al., 2019).

Molibdeno y densidad ósea

A partir de datos epidemiológicos en humanos se encontraron asociaciones inversas entre los niveles séricos de Mo y la densidad ósea, los mecanismos patológicos de estos hallazgos no han sido determinados, sin embargo, se atribuye a sus efectos antagónicos con el Cu y su repercusión en el metabolismo del colágeno y metabolismo óseo. Por otro lado, se postula que los elevados niveles de Mo pueden ser consecuencia de la movilización de Mo de los huesos por los procesos de resorción ósea (Lewis et al., 2016).

Molibdeno y diabetes

Varios estudios describen una correlación entre las concentraciones séricas de Mo y el desarrollo de diabetes (Al-Saleh et al., 2004; Flores et al., 2011). En humanos se han encontrado altos niveles de Mo en pacientes diabéticos y existe una asociación entre los niveles séricos y los indicadores de progresión de esta enfermedad como hemoglobina glicosilada, fructosamina y marcadores renales, pero los mecanismos involucrados en esta relación no han sido dilucidados. Un estudio in vitro sugiere que el Mo tiene un efecto tóxico en células beta del páncreas (Yang et al., 2016).

1.7. Selenio

El Se es un micronutriente esencial encontrado en varios tejidos animales, fue considerado como elemento tóxico hasta 1941 en donde se describe el rol de este mineral como optimizador del crecimiento en pollos. Los tejidos con mayor concentración de este elemento son músculo, hígado, riñón, eritrocitos y músculo cardíaco.

1.7.1. Funciones biológicas y metabolismo

En perros se han determinado 21 selenoproteínas (Benson et al., 2015), la mayoría están relacionadas a su función como antioxidante y difieren por su sustrato y localización tisular, algunas de estas se describen en la siguiente tabla (**Tabla 1**).

Existen fuentes orgánicas (selenocisteína, selenometionina) e inorgánicas (selenito y selenato) de Se en la dieta. Las fuentes orgánicas tienen mayor biodisponibilidad, de hecho, la selenometionina representa la fuente más biodisponible de Se en la dieta en alimentos comerciales para caninos. Otra fuente habitualmente utilizada son las inorgánicas, como selenito o selenato de sodio. Cabe destacar que en general el contenido de Se en los ingredientes de la dieta es muy variable (NRC, 2006). Las fuentes vegetales de Se tienen mejor biodisponibilidad que las fuentes animales. En perros el Se presenta una biodisponibilidad del 20 al 50%, es absorbido en el duodeno, y yeyuno por transporte activo (selenometionina>selenocisteína>selenato) o difusión simple (selenito) (Whanger et al., 1976). El porcentaje de absorción del Se no se correlaciona con el estatus del animal. La

cantidad de glutatión en los enterocitos puede afectar la absorción de este elemento ya que se une al Se y forma seleno-diglutatión, mejorando la absorción intestinal (van Zelst et al., 2017). Su excreción se da principalmente por vía renal y en menor cantidad por vía biliar (Kobayashi et al., 2002).

Tabla 1. Selenoenzimas de importancia en el perro

Enzima	Función/distribución	Referencia
Glutatión peroxidasa	Participa en la detoxificación de peróxidos y de radicales libres a nivel citoplasmático	(Sharadamma et al., 2011)
Yodotironina deionidasa	Presente en: glándula tiroides, corazón, músculo y placenta, hígado, riñón, ovario; permite la conversión	(Pilarczyk et al., 2013).
Tiorredoxina reductasa	Protección antioxidante, se encuentra en testículo	(Surai, 2006).
Selenoproteína H	Regulación de la síntesis de glutatión en células tumorales	(Novoselov et al., 2007)
Selenoproteína P	Transporte plasmático de Se	(Ameri, 2005)
Selenoproteína S	Regulación de citoquinas inflamatorias	(Curran et al., 2005).

1.7.2. Biomarcadores del estatus de Se

Dentro de los biomarcadores más sensibles para determinación del estatus de Se en perros se describen: la determinación de los niveles de Se en suero o plasma, la actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre entera y la excreción fraccional de Se en orina. Estos parámetros son buenos indicadores del estatus de Se en un animal, pudiéndose encontrar cambios desde la primera semana al proporcionar a los animales una dieta deficiente (van Zelst et al., 2016).

1.7.3. Alteraciones del metabolismo de Se en perros

Existen pocos reportes de las alteraciones por deficiencia o exceso de Se en perros de forma natural. Hay un reporte sobre varios casos de muerte súbita en perros adultos en un criadero, provocada por degeneración miocárdica, que se resolvió con la administración de Se y vitamina E (Green and Lemckert, 1977). La deficiencia aguda, experimental, de Se en cachorros causa debilidad muscular, depresión, edema subcutáneo, disnea y coma (Van Vleet, 1975). La ingesta elevada de Se puede ser asociada con hiporexia, vómito, diarrea, anemia microcítica e hipocrómica y daño hepático severo (Thompson et al., 1991). Las deficiencias subclínicas podrían generar alteraciones a largo plazo, en seres humanos se describen trastornos cognitivos, alteraciones inmunológicas y cáncer (Surai, 2006).

Enfermedades Cardiovasculares

En seres humanos se ha encontrado una relación inversa entre los niveles de Se en sangre y la presentación y severidad del fallo cardíaco. La acción protectora se relaciona con la capacidad antioxidante de las enzimas GSH-Px 1 y la tioredoxina reductasa que regula o disminuye el remodelado cardíaco (de Lorgeril et al., 2001).

Diabetes tipo II

El Se es considerado un agente antidiabético ya que protege las membranas celulares de la peroxidación en estados de hiperglucemia pero también en estudios más recientes se describe una acción diabetogénica, atribuida a las propiedades insulino-miméticas del Se que aceleran la resistencia a la insulina en pacientes con diabetes tipo 2 (Bleys et al., 2007).

Urolitiasis

Se han realizado experimentos con suplementación de Se para inhibir la formación de urolitos de oxalato de Ca, los resultados favorables se atribuyen a que el Se disminuye la formación de una glicoproteína (osteoponina) involucrada en la formación del cálculo. En perros suplementados a razón de 0.3mg/kg de dieta se encontraron menores cantidades de osteoponina (Liu et al., 2015).

1.8. Zinc

Es un elemento perteneciente a los metales de transición con valencia +2, es un catión intracelular ampliamente distribuido en tejidos animales (Cousins et al., 2006). Fue reconocido como elemento esencial en animales en 1934 como estimulador del crecimiento en ratas (Todd et al., 1933).

1.8.1. Metabolismo y funciones biológicas

Más del 70% de Zn en el organismo animal está presente en músculo y hueso, además existen altas concentraciones en el hígado, la piel, pelo, uñas, retina y órganos reproductivos masculinos. Es componente de varias enzimas, aproximadamente 300, las cuales intervienen en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, actuando como componente estructural, donador de protones o como sitio de unión entre enzima y sustrato. Algunas de las enzimas que contienen Zn son: lactato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, que participa en el balance ácido-base, SOD con función antioxidante y fosfatasa alcalina. También interviene en la producción de testosterona, en el crecimiento, integridad cutánea, integridad de membranas celulares y función inmunológica (Cousins et al., 2006). El Zn induce la síntesis de MT, proteínas reguladoras del metabolismo de varios elementos como Cu y Zn (Nordberg, 1998; Miles et

al., 2000). También es importante para el metabolismo de la vitamina A y es cofactor para la síntesis de ADN y ARN.

La absorción intestinal del Zn tiene lugar en el duodeno, la absorción se incrementa en condiciones de deficiencia y es menor cuando bajan las necesidades de este elemento. Los fitatos, el Ca, Mg, Fe y Cu disminuyen su absorción; mientras que ciertos aminoácidos como metionina o lisina la favorecen. Los alimentos comerciales son suplementados con este mineral principalmente como carbonato o sulfato de Zn. La biodisponibilidad de éstos es menor que la de los compuestos orgánicos como Zn- aminoácido, Zn- polisacárido (Özpinar et al., 2001).

La captación y translocación celular de Zn es regulada por transportadores específicos, y se excreta por vía biliar y también a través de secreción pancreática exocrina (Trevizan et al., 2013).

1.8.2. Biomarcadores del estatus de Zn

En condiciones de deficiencia, el Zn no se moviliza fácilmente de sus sitios de reserva (músculo y hueso, más del 70%) es por eso que con una dieta deficiente en este mineral habrá una depleción del Zn plasmático, en perros los niveles normales de Zn en el plasma son aproximadamente de 0.76 µg/mL (Mert et al., 2008). Otros de los biomarcadores propuestos que son sensibles a los cambios en la suplementación con Zn son la medición de Zn en orina y pelo. La medición de las concentraciones de Zn en suero y pelo en perros son corroborativos en enfermedad cutánea (Van den Broek and Stafford, 1988).

1.8.3. Alteraciones del metabolismo de Zn en perros

Durante el desarrollo fetal la deficiencia de Zn tiene efectos teratogénicos y puede conducir a paladar hendido, malformaciones cerebrales, cardiopulmonares y esqueléticas y alteraciones inmunológicas evidenciadas por ausencia marcada de linfocitos en el timo, linfonodos y bazo, consistentes con una alteración en el desarrollo y migración de células T (Cummings and Kovacic, 2009).

En animales jóvenes la deficiencia de Zn puede causar retraso en el crecimiento, anorexia, y alteraciones dermatológicas derivadas de paraqueratosis, asociada a reducción en los procesos de replicación celular (Beigh et al., 2017).

La acrodermatitis letal es un desorden autosómico recesivo descrito en el Bull Terrier y tiene como característica que no responde a la suplementación con Zn oral o parenteral, sus signos principales incluyen alteraciones gastrointestinales, alteraciones del comportamiento e infecciones recurrentes debido a alteración de la inmunidad celular. La edad de presentación es de 6 semanas y los signos dermatológicos son pioderma,

hiperqueratosis nasal y de almohadillas plantares. La mayoría de animales afectados mueren antes del año de edad (Colombini, 1999).

La dermatosis que responde al Zn es una alteración asociada a razas nórdicas como Husky siberiano, Alaskan malamute o Samoyedo. Debido a un defecto primario en la absorción de Zn de la dieta. La edad promedio de presentación es antes de los dos años de edad, las lesiones dermatológicas descritas son alopecia focalizada, eritema y lesiones costrosas alrededor de ojos, nariz, boca, orejas y puntos de presión (White et al., 2001).

De forma secundaria la deficiencia de Zn puede estar causada por desequilibrios nutricionales debido a altos niveles de Ca y fitato provenientes de proteína vegetal que disminuyan su biodisponibilidad. También se puede generar deficiencia por enfermedad hepática (Fieten et al., 2012a), fallo renal crónico (Sandhu et al., 2005), síndrome de mala absorción y cáncer (Gumulec et al., 2014). Las lesiones cutáneas desarrolladas en estos animales tienen características histopatológicas similares a las observadas en la forma primaria.

El tratamiento en estos animales consiste en la suplementación de Zn durante toda la vida del animal en la mayoría de casos primarios y corrección de la dieta en casos secundarios. El sulfato de Zn en dosis de 10 mg/kg/d es el tratamiento más utilizado y la resolución de los signos se observa en un período de 2 a 6 semanas hasta 200 días en algunos casos (Beigh et al., 2017).

2. METALES TÓXICOS

Son considerados tóxicos, los elementos que producen alteraciones orgánicas en el organismo, aunque se encuentren en niveles muy bajos. Los de mayor interés por su toxicidad son el As, Cd, Hg y Pb, aunque también son considerados el Al, boro (B) y bromo (Br) (Goyer and Clarkson, 2001).

Las fuentes de exposición a metales tóxicos en perros son diversas. Aunque existen entidades que regulan la composición de los piensos para perro (FEDIAF, 2012), éstos pueden considerarse una fuente de ingestión de metales tóxicos en ciertos casos. Los productos utilizados como materia prima para su elaboración pueden contener niveles elevados de minerales de forma natural. Algunos tipos de pescado pueden contener niveles altos de Hg debido a la liberación de contaminantes industriales al mar. Lo mismo sucede con productos vegetales provenientes de áreas de alta polución. El medio en el que los animales viven, el agua y aire pueden ser fuentes de exposición.

Mecanismos de toxicidad

Los efectos adversos que producen los elementos tóxicos dependen del grado de exposición y pueden ser leves o causar patologías específicas y muerte. Los efectos derivados de exposición crónica varían de acuerdo al elemento y entre estos están los efectos mutágenos, carcinogénicos, teratogénicos, inmunosupresión, baja condición corporal, entre otros (Park et al., 2005).

En general, la toxicidad por metales puede producirse por competencia con minerales esenciales disminuyendo o anulando su actividad, por ejemplo, Br-cloro (Cl); Pb-Zn-Ca. Por daño oxidativo a membranas y macromoléculas y por producción de radicales libres o desactivación de los sistemas de defensa antioxidante, estando implicados metales como As, Cd, Hg, Ni o Pb (Goyer and Clarkson, 2001).

Los animales son más susceptibles a la intoxicación en etapas embrionarias, de crecimiento, enfermedad o vejez; y en etapa adulta tienen menor susceptibilidad, sin embargo algunos elementos tóxicos como el Cd, el Pb y el Hg se acumulan a lo largo de la vida del animal ya que no son excretados con facilidad (Bampidis et al., 2013).

2.1. Arsénico

El As es un metaloide no aceptado como nutriente esencial en animales o seres humanos, aunque se ha propuesto que puede tener efectos benéficos en cantidades ultratraza (Anke, 1986; Uthus, 1994; Nielsen, 1998). Sin embargo, actualmente varios compuestos de As son considerados como carcinógenos de clase I y III (IARC, 2012).

Se encuentra presente en varias formas orgánicas e inorgánicas con valencia (III) y (V) en fuentes naturales como suelo y agua o también puede provenir de fuentes antropogénicas (Francesconi and Kuehnelt, 2002). Se encuentra de forma natural en pescado y mariscos como As orgánico (Rose et al., 2007). En perros, algunos compuestos arsenicales orgánicos como la melarsomina son usados como tratamiento de Dirofilariosis (Guidelines, 2014).

La toxicidad de los compuestos arsenicales varía ampliamente de acuerdo a su especiación siendo el arsenito inorgánico el de mayor toxicidad (EFSA, 2014).

2.1.1. Metabolismo

La biodisponibilidad del As inorgánico depende de su solubilidad, en agua de bebida puede absorberse en su totalidad si es soluble, las formas orgánicas tienen una biodisponibilidad de más del 90% en algunas especies (Francesconi et al., 2002). Después de su absorción, el riñón del perro reduce el arsenato a arsenito y es excretado en orina poco tiempo después. También puede ser eliminado en orina como ácido dimetil arcínico (DMA) (Charbonneau

et al., 1979). En el perro la cantidad excretada por vía biliar es mínima (Klaassen, 1974). El metabolismo de los compuestos arsenicales orgánicos es desconocido en perros.

2.1.2. Mecanismo de toxicidad

Entre los mecanismos de toxicidad descritos están el daño oxidativo induciendo muerte celular (Hughes, 2002). El As pentavalente crea competencia con elementos esenciales como el P, ya que puede remplazar a este elemento en reacciones bioquímicas con fosfatos alterando procesos como la glucólisis. También altera los procesos de reparación del ADN, por lo que ejerce su acción carcinogénica (Ratnaike, 2003; Hunt et al., 2014)

2.1.3. Fuentes de exposición

En perros las principales fuentes potenciales son el agua y los alimentos. Los productos a base de pescado contienen As orgánico de forma natural como arsenobetaína o arsenoazúcares considerados de baja toxicidad (Olmedo et al., 2013). El arroz también puede ser una fuente potencial de As inorgánico (Rahman et al., 2007). El límite aceptado por la legislación europea para alimento de mascotas es de 2.3 mg/kg MS aunque puede llegar hasta 11 mg/Kg MS si tiene como ingredientes productos de pescado o derivados.

Los signos de exposición al arsénico en animales han sido descritos como retraso en el crecimiento, disminución del consumo de alimento, anemia, ataxia y convulsiones en intoxicaciones agudas. En perros que consumieron entre 2.3 a 4.6 mg/kg peso/día durante 180 días se produjo disminución del crecimiento y ganancia de peso e incremento de las enzimas hepática ALT y AST (Neiger and Osweiler, 1992).

2.2. Cadmio

Es un metal divalente presente en la corteza terrestre de forma natural y con propiedades similares al Zn y extraído como subproducto en la extracción de éste. Es utilizado en la fabricación de baterías, soldaduras, aunque cada vez es menor su utilización (ATSDR, 2012).

2.2.1. Metabolismo

La absorción en el tracto gastrointestinal está entre 1 y 5% en varias especies de monogástricos (ATSDR, 2012). Es posible que comparta transportadores de otros metales divalentes como el Zn, Fe, Mn (DMT1) (Vesey, 2010). En condiciones de exposición crónica, su absorción disminuye por inducción de MT (Klaassen et al., 2009). Se acumula gran parte en riñón, y en menor cantidad, en hígado. Los niveles sanguíneos, son indicativos de exposición reciente pero no están correlacionados con los niveles acumulados a nivel orgánico (Matsuno et al., 1991).

En el riñón se almacena unido a MT, desplazando al Cu y al Zn de los sitios de unión a estas proteínas (Gumasta et al., 2019). Su tasa de excreción es muy baja y se da por vía renal. El tiempo de vida media en perros es de 1 a 2 años y se acumula con la edad de los animales (Matsuno et al., 1991).

2.2.2. Mecanismos de toxicidad

El Cd disminuye la capacidad antioxidante celular por depleción de glutatión; altera la membrana glomerular, produce fibrosis intersticial renal y destrucción de células mesangiales (Moulis, 2010). También produce infertilidad en machos y tiene efectos estrogénicos en hembras; puede generar interacciones con elementos esenciales como el Zn y el Ca, además la anemia puede ser un signo de toxicidad por Cd por disminución en la absorción de Fe (Nomiyama and Nomiyama, 1984).

2.2.3. Fuentes de exposición

Las sales minerales para suplementación de Zn y P en alimentos balanceados pueden estar contaminadas con Cd. En el fosfato de Ca se han encontrado niveles entre 1 a 67mg/kg de Cd (Sullivan et al., 1994).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido un máximo de 1 mg/kg de Cd en alimentos de animales de consumo. Los piensos para perros elaborados con vísceras de animales expuestos pueden ser una fuente de ingesta de Cd, de igual manera en perros alimentados a base de vísceras. El humo del cigarrillo también puede ser una fuente de exposición en mascotas. Los niveles de Cd tolerados por los animales de compañía aún no han sido establecidos.

2.3. Mercurio

El Hg existe en el medio ambiente en tres estados como Hg elemental (metálico), Hg inorgánico y Hg orgánico. Más del 80% proviene de fuentes antropogénicas (minería, fundiciones, etc). De los compuestos organometálicos, el metilmercurio es el más abundante. La principal fuente natural de Hg proviene de actividad volcánica, en sistemas acuáticos es transformado en metilmercurio por bacterias y hongos y de aquí entra en la cadena alimenticia (NRC, 2005). La mayor fuente de exposición a Hg en perros proviene del alimento, en especial los alimentos que contienen ingredientes a base de pescado, que tienen niveles más altos que los elaborados con otras fuentes de proteína (Luippold and Gustin, 2016). El límite máximo de Hg en alimentos para mascotas en Europa es 0.3mg/kg MS. Los niveles de Hg determinados en dietas para perro generalmente están por debajo de este límite (Kim et al., 2018b; Pedrinelli et al., 2019).

2.3.1. Mecanismo de toxicidad.

La toxicidad por Hg varía de acuerdo con su fórmula química. La toxicidad por Hg inorgánico en perros es poco común y generalmente accidental, su biodisponibilidad es muy variable y depende de factores como la solubilidad y fórmula química, la edad de los animales afecta su absorción y puede ser mayor en animales jóvenes (Farrar et al., 1994). La absorción de metilmercurio en mamíferos es alta y puede superar el 90%. Su alta afinidad por el grupo sulfidrido en aminoácidos y proteínas es considerada como su principal mecanismo de toxicidad, inhibe acciones enzimáticas del metabolismo proteico, induce daño oxidativo celular y disfunción mitocondrial (Bampidis et al., 2013). La GSH-Px y la inducción de MT actúan como medios de protección celular. La suplementación con Se y vitamina E ejercen un mecanismo de protección.

2.3.2. Toxicidad mercurio

Existen reportes de toxicidad aguda y crónica por mercurio en perros, las alteraciones son principalmente fallo renal agudo, degeneración y atrofia tubular renal y glomerulonefropatías (Hansmann et al., 2009).

Toxicidad por metilmercurio: El sistema nervioso central es el más afectado por la ingesta de metilmercurio, en estudios de intoxicación natural o experimental en perros se describen alteraciones sensoriales y alteraciones del movimiento como ataxia. En exámenes histopatológicos se demuestra que la corteza cerebral es la más afectada con pérdida neuronal y depósito de tejido conectivo (Hansew, J et al., 1989).

2.4. Plomo

El Pb en la corteza terrestre se encuentra principalmente como sulfuro de Pb, en combinación con otros elementos como el Zn. Es utilizado en la industria, en la fabricación de baterías, construcción, tanques de almacenamiento, y protección contra la radiación. Es un metal altamente tóxico del que no se conoce ninguna función metabólica beneficiosa en organismos vivos, sin embargo las toxicosis por Pb han disminuido por el extenso control sobre el uso de este elemento en las gasolinas, pinturas, etc. (EFSA, 2010).

2.4.1. Metabolismo

Es absorbido en el intestino delgado, los niveles de absorción disminuyen a mayor concentración de Pb en el intestino. Es transportado por DMT1, al igual que otros elementos esenciales; su biodisponibilidad depende de la forma química, solubilidad, y de la presencia de alimento ya que en condiciones de ayuno se absorbe en mayor proporción. El Ca y P inhiben su absorción. Por otra parte, la deficiencia de Fe incrementa la absorción de Pb (Knight and Kumar, 2003).

En la circulación, es transportado en el eritrocito unido a la hemoglobina, o unido a las proteínas plasmáticas como albumina. Dentro de las células permanece en el citosol unido a proteínas de alta afinidad o a MT. Se almacena principalmente en tejido óseo, formando complejos con el fosfato y remplazando al Ca en la hidroxiapatita (Cole et al., 2015).

El Pb orgánico, de mayor toxicidad, es metabolizado en hígado y excretado por vía biliar y renal. En perros predomina la vía renal en dosis bajas y a medida que se incrementa el nivel de Pb en el organismo, la vía biliar toma mayor importancia (Klaassen and Shoeman, 1974). En el organismo, las fuentes orgánicas son metabolizadas a compuestos inorgánicos.

2.4.2. Fuentes de exposición

Las principales fuentes de contaminación son antropogénicas. En alimentos, algunas mezclas minerales o compuestos que forman parte de premezclas (óxido de Zn) pueden contener altos niveles de Pb (Adamse et al., 2017). En alimentos para mascotas, el límite máximo es de 5 mg/Kg MS. Su uso en pintura y materiales de construcción está actualmente prohibido, sin embargo en casas antiguas, los animales de compañía pueden estar expuestos a polvo o suelos que contienen Pb (Knight and Kumar, 2003).

2.4.3. Signos de toxicidad

Toxicidad aguda: La exposición accidental en perros puede causar signos neurológicos como convulsiones, depresión; signos digestivos como vómitos, diarrea, salivación, dolor abdominal (Berny et al., 1992). Las dosis descritas como letales en intoxicaciones agudas en perros son 191 mg/kg peso de acetato de Pb (el de mayor biodisponibilidad) 1300 a 1366 mg/kg de óxido de Pb o sulfato de Pb respectivamente (ATSDR, 1999).

Toxicidad crónica: La intoxicación crónica por Pb se relaciona con alteraciones neurológicas, hematológicas (Khanna et al., 1992), renales y hepáticas (Morgan, 1994) principalmente en perros, también se han descrito casos de pérdida de densidad ósea, fracturas patológicas múltiples y unión ósea retardada en perros con valores elevados de Pb en hueso y normales en sangre (Cole et al., 2015).

En un estudio retrospectivo de 53 casos de intoxicación por Pb en perros, los niveles sanguíneos estuvieron entre 400 a 6200 µg/L los signos principales fueron neurológicos y gastrointestinales (Morgan, 1994). Los niveles sanguíneos máximos descritos para perros varían según la fuente entre 78 a 200 µg/L (Cole et al., 2015); o hasta 350 µg/L (Prescott, 1983).

3. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS ESENCIALES EN SUERO

La determinación de los niveles séricos de los elementos esenciales, también conocidos como oligoelementos, microminerales o elementos traza constituye un método no invasivo que permite la monitorización de variaciones en el metabolismo mineral; las cuales pueden ser causa o consecuencia de patologías agudas o crónicas (Roussel, 2000). Con el uso de métodos analíticos multi-elementales o multi-elemento, como la espectroscopia de emisión o masas (ICP), es posible obtener información de varios minerales en una sola muestra, corregir posibles deficiencias, prevenir patologías asociadas o conocer factores de riesgo de un animal a una enfermedad (Vitale et al., 2019).

En medicina humana existen parámetros de referencia de los valores séricos de varios elementos y existen estudios de la variación del perfil mineral y el desarrollo de patologías. En perros existe poca información sobre parámetros de referencia (Mert et al., 2008) y variación respecto a patologías. En la **Tabla 2** se recogen los niveles de elementos traza en suero en perros.

Está claro que los valores séricos no siempre son un reflejo del estatus mineral del animal para un determinado elemento, como sería el caso de Cu, en la que el hígado nos daría una información más fehaciente de su estatus. En otros casos como Se y Zn, los valores séricos, son considerados biomarcadores sensibles de estatus mineral (Van den Broek and Stafford, 1988; van Zelst et al., 2016). Estudios recientes han demostrado que algunas patologías producen cambios en los niveles séricos de minerales y éstos pueden ser una causa para su desarrollo o contribuir a la morbilidad o mortalidad (Prasad et al., 2014); por otro lado también han sido utilizados como marcadores de pronóstico de una enfermedad (Nangliya et al., 2015).

Estudios epidemiológicos en medicina humana describen que existe un rango óptimo de niveles séricos de microelementos en los cuales un individuo tiene el menor riesgo relativo de desarrollar una patología enfocado a minimizar la presentación de enfermedades crónicas. Por encima o por debajo de estos rangos se incrementa el riesgo de morbilidad y mortalidad. Un ejemplo de esto es el Zn. En un estudio realizado por Wu y colaboradores, al evaluar los riesgos de muerte por cáncer en seres humanos en un estudio con 6000 individuos adultos, se encontró que en un rango de concentración sérica de Zn de 860 a 1030 µg/L con un promedio de 950 µg/L el riesgo relativo es de 1 y con valores inferiores a 570 µg/L o superiores a 2300 µg/L el riesgo se incrementa en 1.45 y 1.16 respectivamente. En el caso del Fe, constataron que el rango en el cual existe menor riesgo relativo de desarrollo de cáncer estuvo entre 610 y 940 µg/L, en niveles menores a 380 y superiores a 1670 el riesgo se incrementa en 1.15 y 1.53 respectivamente (Wu et al., 2004). En humana, además este tipo de trabajos tienen estudios con rangos de referencia bien establecidos en individuos sanos.

Tabla 2. Concentraciones de elementos traza en suero en perro (expresados en $\mu\text{g/L}$ y medias aritméticas).

Tipo estudio /país	N	Elemento									Referencia
		Co	Cu	Cr	Fe	Mn	Mo	Ni	Se	Zn	
Valores de referencia ¹			200-800		940-1220	20		1.8-4.2	220 ^a	700-2000	(Puls R, 1994)
<i>Estudio poblacional</i>											
Turquía ¹	73	24	830		1320	10		13		730	(Mert et al., 2008)
Polonia ²	48		1363	249	1690	683				1523	(Tomza-Marciniak et al., 2012)
<i>Perros control sanos</i>											
Italia ²	31		780	130		20		230	230	1970	(Zaccaroni et al., 2014)
India ¹	10	36.6 ±3.6	1050±21		872±21	172 ±2				642±10	(Dash et al., 2018)
USA ^{3,b}	50	0.30	450		1625	3.15	8.45		300	740	(Vitale et al., 2019)
Bulgaria ²	10		946±143			24±5			291 ±57	1692±180	(Enginler et al., 2015)
Turquía ⁴	10		1006±12		860±199					620±76	(Seyrek et al., 2009)
USA ^{1,4}	50			4.66±2.83	1751±567					1220±360	(Kazmierski et al., 2001)
Turquía ^{4,b}	16		511±59		1543±240	20±1					(Kim et al., 2012)
Iran ⁴	14		1514±255		1730					593±26	(Soltanian et al., 2016)

N: número de muestras. ^a sangre entera. ^b mediana

Técnica analítica: Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA); ² Espectroscopía de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-OES); ³ Espectroscopía de Masas con Fuente de Plasma Acoplado; ⁴ Espectroscopía UV

En veterinaria, en animales de compañía, la información es menor y existe variabilidad de acuerdo a los métodos de estimación y las características de los animales utilizados encontrándose diferencias por edad, estado fisiológico e incluso por razas (Mert et al., 2008). Conocer la variación en el perfil mineral en una patología determinada, puede contribuir a modificar las recomendaciones de ingesta diaria de un elemento en animales enfermos y permitir una nutrición terapéutica enfocada a la enfermedad, ya que los requerimientos minerales en perros están enfocados en animales sanos y en mantener un buen estado de salud en todas las etapas de vida. Un ejemplo de esto es la recomendación de disminuir la ingesta de Cu y la suplementación con Zn en las dietas hepáticas (Fieten et al., 2015).

Los procesos metabólicos en los que participan los microminerales requieren un rango óptimo de concentración para mantenerse funcionales y cualquier exceso o deficiencia altera su actividad, la evaluación de la composición de un alimento no permite predecir las variaciones individuales de un animal en cuanto a la biodisponibilidad. Los valores sanguíneos podrían reflejar esto de mejor manera. La determinación de los niveles séricos en animales normales también es útil para la monitorización de suplementos minerales ofrecidos a un animal de compañía ya que son un buen reflejo del estatus mineral a corto plazo (Btaiche et al., 2011).

4. VARIACIÓN DE ELEMENTOS ESENCIALES EN SUERO EN DIFERENTES PROCESOS PATOLÓGICOS

4.1. Enfermedades inflamatorias

La inflamación se define como la reacción de un tejido frente a un daño local, que genera respuestas vasculares y celulares. Puede ser producida por varios factores como microorganismos, agentes físicos, toxinas, presencia de tejido necrótico o por reacciones inmunomediadas. Durante la inflamación, la liberación de citoquinas y mediadores inflamatorios altera la homeostasis de elementos como Cu, Fe, Mn o Zn produciendo variaciones a nivel sanguíneo. Esta condición suele ser multifactorial y se ha sugerido que puede deberse a la movilización de estos microelementos desde el plasma hacia el espacio intersticial o intracelular (Akçil et al., 2003).

En condiciones inflamatorias severas como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) se han encontrado en general niveles elevados de Cu y disminuidos de Fe, Se y Zn (Geoghegan et al., 2006).

Uno de los mecanismos de defensa innatos consiste en disminuir la disponibilidad de ciertos elementos traza como Fe, Mn y Zn durante procesos infecciosos a fin de impedir su

utilización por microorganismos patógenos. La calprotectina es una proteína citosólica de los neutrófilos, que actúa atrapando al Mn y Zn en infecciones bacterianas e inflamatorias, y disminuyendo sus niveles plasmáticos; estos elementos son esenciales para el metabolismo bacteriano (Abdel-Razik et al., 2016).

En enfermedades infecciosas sucede algo similar con el Fe, a nivel plasmático el Fe se reduce ya que es retenido a nivel intracelular a fin de retardar el crecimiento bacteriano (Carver, 2013). Varios estudios soportan la idea de que altos niveles de Fe sanguíneo incrementan la susceptibilidad a infecciones. El Fe circula unido a la hemoglobina dentro del eritrocito, y en el plasma es transportado por proteínas, principalmente, transferrina y una vez superado el umbral o la capacidad de unión a esta, el Fe libre, en la circulación queda disponible para utilización por los microorganismos (Zager et al., 2004). En enfermedades inflamatorias, la transferrina a nivel extracelular y la ferritina intracelular constituyen mecanismos de protección contra enfermedades infecciosas disminuyendo la disponibilidad de Fe para crecimiento bacteriano además de la hepcidina que impide la movilización de Fe intracelular, igualmente impide el paso del Fe absorbido a nivel intestinal hacia el torrente sanguíneo. Su actividad es estimulada por la interleucina (IL)-6 (Wrighting and Andrews, 2006).

El Zn es un elemento clave para el funcionamiento del sistema inmunológico, junto con el Cu participa en procesos de reparación tisular y formación de colágeno, además previene la muerte celular de tejidos sanos durante la inflamación. La disminución sérica de Zn podría estar causada por una mayor demanda tisular durante procesos inflamatorios y se han encontrado acumulaciones de Zn en tejidos alterados. La IL-1 moviliza el Zn plasmático hacia el hígado y estimula la síntesis y liberación de ceruloplasmina, proteína de fase aguda que contiene Cu (Foster and Samman, 2012).

En seres humanos, la disminución de los niveles séricos de Zn ha sido asociada con enfermedades inflamatorias crónicas como la osteoartritis. Las concentraciones séricas muestran una relación directa negativa con la producción de citoquinas proinflamatorias y factor de necrosis tumoral (TNF- α). El efecto de la deficiencia de Zn como factor de alteración de la respuesta inmunitaria ha sido demostrado *in vivo* e *in vitro* (Mayer et al., 2014).

4.2. Anemia por inflamación crónica

Es considerada un mecanismo evolutivo de protección para reducir la disponibilidad de Fe y se presenta en condiciones inflamatorias, neoplásicas, disfunción multiorgánica, traumatismos o enfermedad renal, con modificaciones en el metabolismo del Fe, que produce una deficiencia funcional. La anemia suele ser de leve a moderada, no regenerativa

y el tamaño eritrocitario suele estar bajo o cercano al normal. En estos casos existe mayor expresión de hepcidina; proteína de bajo peso molecular, sintetizada en el hígado que cumple un rol central en la homeostasis de Fe en vertebrados; regula o inhibe su absorción represando Fe en el enterocito, moviliza el Fe unido a ferritina en los tejidos y regula la acción de ferroportina, el principal exportador de Fe a nivel celular. En perros la expresión de hepcidina incrementa por exceso de Fe plasmático e inflamación; y disminuye en condiciones de hipoxia y anemia (Marques et al., 2017).

Además del secuestro de Fe al interior de las células, la activación de células T y monocitos, productores de mediadores inflamatorios como IL-1, 6, 10 inducen la movilización del Fe corporal (Lan et al., 2004). Además, se produce la inhibición de precursores eritroides mediado por interferones y TNF, lo que contribuye a los bajos índices de regeneración en este tipo de anemias (Weiss and Goodnough, 2005).

4.3. Enfermedad renal

En perros existen varios factores que desencadenan un fallo renal produciendo una disminución de la tasa de filtración glomerular, retención de compuestos urémicos y en algunos casos proteinuria. Existen metales claramente identificados como nefrotóxicos, entre estos están el Cd, Pb, Hg, y As, que pueden producir fallo renal agudo, necrosis tubular y daño oxidativo a nivel renal (Barbier et al., 2005). Pero también la enfermedad renal puede ser la causa de alteraciones en el metabolismo de elementos esenciales por incremento o disminución en la excreción de estos, llevando al animal a tener complicaciones derivadas de estos desbalances. En estudios realizados para evaluar el perfil mineral en pacientes con fallo renal se observa que las alteraciones van relacionadas a los niveles de uremia y en general se encuentran incrementados los niveles de Mo y Cr y disminuidos de Se y Zn (Vanholder et al., 2002).

Algunos elementos esenciales como Zn, Cu, Fe y tóxicos como Cd y Pb se movilizan a través de las membranas celulares tubulares mediante transportadores de metales como DMT1. Estos procesos de regulación de excreción o reabsorción de elementos se da en un 70% en el túbulo proximal (Gachot et al., 1991). En ciertos casos puede existir competencia por moléculas transportadoras con entrada a la célula de elementos tóxicos e impidiendo la resorción de elementos esenciales y su consiguiente pérdida en orina. Otro mecanismo patológico descrito que genera mayor excreción urinaria de elementos esenciales se produce en el caso del Zn. El Zn se transporta en el plasma unido a proteínas, las cuales deben ser reabsorbidas del ultrafiltrado glomerular mediante cotransportadores. Estos mecanismos, dependientes de energía, se ven alterados en enfermedad renal produciendo un aumento de la excreción de Zn en orina y una disminución a nivel sanguíneo (Mafra et

al., 2002). En un estudio en perros y gatos con necrosis intersticial crónica se midió la excreción de algunos elementos esenciales en orina; en los animales afectados se observó una mayor excreción de Cu y Se y una disminución de excreción de Mo (Alborough et al., 2020).

Dado que los niveles séricos de Zn son un buen indicador del estatus, los animales con enfermedad renal crónica y bajos niveles de Zn, pueden estar en riesgo de presentar alteraciones derivadas de su deficiencia como anorexia, alteraciones en piel y pelaje e inmunodeficiencia. En pacientes humanos con enfermedad renal se han encontrado mayores niveles de excreción urinaria de Zn y disminución de los niveles séricos de este elemento (Esfahani et al., 2006).

En cuanto al Se, su excreción también se ve incrementada en enfermedad renal en perros (Alborough et al., 2020) y seres humanos. Los bajos niveles séricos de Se han sido asociados con hipertensión y trastornos cardiovasculares (Davenport, 2015).

4.4. Enfermedades oncológicas

En perros, una de las enfermedades crónicas más comunes es el cáncer (desarrollo de tumores malignos); aproximadamente 1 de cada 4 animales (EEUU), mueren por patologías oncológicas (Fleming et al., 2011). Los tipos de neoplasias más comunes en perros son el carcinoma mamario, osteosarcomas, linfoma, sarcoma de tejidos blandos y mastocitoma (Meuten, 2016). Varios factores de riesgo han sido encontrados, entre ellos la raza, edad, estado reproductivo y la exposición a carcinógenos (Withrow et al., 2020).

Los microminerales como el Cu, Fe, Mn y Se son esenciales para varias funciones biológicas, sin embargo, también tienen la capacidad de actuar como prooxidantes (Cu, Fe) (Nzengue et al., 2011) o ser potencialmente carcinogénicos (Se) (dos Reis et al., 2017). El Cu, Zn y Mn son constituyentes de la enzima SOD, Cu/Zn SOD y Mn SOD. El Se forma parte de la GSH-Px. Todas estas enzimas contribuyen a los mecanismos de defensa celulares contra el daño oxidativo por radicales libres (Russo and Bracarense, 2016).

Los tejidos neoplásicos suelen acumular elementos como Al, Cu, Se y Fe. Se ha propuesto la idea de que las células neoplásicas incorporan estos elementos para su proliferación (Smith et al., 2007). Las enzimas antioxidantes también se encuentran en altas concentraciones en tejidos tumorales (Enginler et al., 2015).

En un estudio reciente acerca de la variación de los niveles de Cu y otros elementos en perros con carcinoma hepatocelular observaron un incremento en los niveles hepáticos de Cu y una bajada del Fe, Se y Zn en relación a pacientes sanos; lo que sugiere, puede estar relacionado con la patogénesis del propio tumor (Harro et al., 2019).

En un estudio realizado para ver la influencia de la dieta casera o comercial con los niveles séricos y tisulares de Cu, Fe, Mn y Zn en perros con neoplasias mamarias malignas y perros sanos, se encontró que la dieta influye en los valores séricos de estos animales y pese a que los perros enfermos que consumen dietas caseras tienen menores niveles séricos de Mn y Zn, en el tejido tumoral presentan mayor acumulación comparado con tejido mamario sano (Dash et al., 2018).

Estas patologías tienen en común la generación de estrés oxidativo, causado por la actividad biológica del tumor y por la inflamación que pueden generar en el organismo. También la presencia de radicales libres pueden ser la causa del desarrollo tumoral ya que producen daño al ADN y alteran las señales biológicas para muerte celular programada y control de crecimiento tumoral. En perros con linfoma y con cáncer de mama se ha encontrado mayor nivel de peroxidación lipídica, estrés oxidativo y disminución de agentes antioxidantes comparados con perros sanos (Macotpet et al., 2013). Además los niveles séricos de Cu, Se y Fe se encuentran elevados en animales con enfermedades oncológicas (tumores mamarios) (Askar et al., 2009) y los niveles de Zn suelen estar disminuidos (Kazmierski et al., 2001).

El cáncer de próstata en perros tiene menor incidencia que en seres humanos (Leroy and Northrup, 2009), si bien en ambas especies se ha visto que los niveles séricos de Zn muy elevados o disminuidos son un factor de riesgo para su desarrollo (Saleh et al., 2020).

En algunos estudios, el análisis del perfil mineral en pelo en varias especies con neoplasias reveló que estos individuos tienen mayores niveles de Fe, Zn, Al y Cu comparado con individuos sanos (Pasha et al., 2010; Sanagoo et al., 2020). En un estudio en perros, sin embargo, los resultados fueron opuestos (Badea et al., 2018). La medición de elementos en el pelo representa un marcador de exposición crónica a estos elementos.

El Fe puede constituir un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer, su acumulación puede generar transformación de células normales en células malignas por incremento del daño oxidativo ya que la actividad de H_2O_2 se incrementa en presencia de Fe (Toyokuni, 2008). En personas con hepatitis viral o cirrosis hepática, se han encontrado altas cantidades de Fe no unido a ferritina y es considerado como causa del desarrollo de carcinoma hepatocelular en estos individuos. En animales, la administración de Fe dextrano ha provocado la aparición de sarcomas (Chen et al., 1999). En medicina humana, algunos estudios epidemiológicos señalan al exceso de Fe como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer. Para estados de deficiencia, la evidencia es menor pero hay reportes de incremento en la incidencia de cáncer de hígado, riñón y vejiga en pacientes con anemia por deficiencia de Fe (Park et al., 2015). Las células de rápido crecimiento, como las células tumorales, expresan mayor cantidad de receptores de transferrina y los niveles séricos elevados de Fe pueden ser un factor de crecimiento de estas células (Beguin et al., 2013).

El Se puede actuar como elemento protector por su acción antioxidante en enfermedades oncológicas, el selenito o selenato pueden actuar como prooxidantes e inducir apoptosis en células tumorales (Rayman, 2005); pero también se ha relacionado con el desarrollo de tumores. En humanos, la selenometionina puede inducir el desarrollo de células malignas (Drake, 2006). En perros la suplementación de Se para disminuir la incidencia de enfermedades oncológicas es inconsistente (Pilarczyk et al., 2013). Se ha descrito una relación cuadrática (curva en U) en perros entre los niveles de Se y el riesgo de desarrollo de cáncer de próstata, en donde se describe un estatus óptimo y cualquier deficiencia o exceso incrementa el riesgo de desarrollo de la enfermedad (Waters and Chiang, 2018). Estudios similares hay en medicina humana, en donde se describe que con niveles séricos de Se menores a 106 µg/L, el riesgo del desarrollo de cáncer pulmonar es menor y con valores mayores a 122 µg/L el riesgo se incrementa (Fritz et al., 2011).

El Zn interviene en varios procesos de proliferación, diferenciación celular y regulación de apoptosis. Actúa como segundo mensajero celular y actualmente es reconocido como un agente potencial en el tratamiento del cáncer en humanos (Ziliotto et al., 2018). Este elemento puede ejercer un mecanismo protector contra la proliferación tumoral porque inhibe enzimas que participan en procesos de crecimiento aberrante encontradas en células cancerígenas (Hirano et al., 2008). El cáncer de próstata es caracterizado por una disminución temprana de los niveles plasmáticos de Zn (Costello and Franklin, 2016), sin embargo, en otros tipos de tumores como los mamarios existe una sobreexpresión de moléculas importadoras de Zn (Zip7) y acumulación en estos tejidos (Gumulec et al., 2014). Las alteraciones en el metabolismo de Zn en enfermedades oncológicas parecen estar relacionadas a la pérdida en la regulación de expresión de sus proteínas transportadoras como los descritos en tumores pancreático, de próstata y mama (Taylor et al., 2008).

5. ENFERMEDAD HEPÁTICA CANINA ASOCIADA AL COBRE¹

5.1. Introducción

La enfermedad hepática canina es un problema común en la clínica diaria, con una prevalencia del 12% (Fuentealba et al., 1997; Watson et al., 2007), y dentro de ellas aproximadamente un tercio de las alteraciones hepáticas están relacionadas al Cu (Poldervaart et al., 2009; Webster et al., 2019). Recientemente se acaba de publicar un documento de consenso para el diagnóstico y tratamiento de la hepatitis crónica canina (ACVIM consensus statement on the diagnosis and treatment of chronic hepatitis in dogs), que nos permite un mejor manejo de nuestros pacientes, y que hemos seguido para el desarrollo de este documento (Webster et al., 2019).

La acumulación de Cu en perros está asociada a alteraciones importantes en la estructura y función hepática que puede resultar en hepatitis aguda, hepatitis crónica y cirrosis. Se describió por primera vez en el Bedlington terrier en 1975 (Twedt et al., 1979, Su et al., 1982) y posteriormente en otras razas.

La distribución de Cu y su excreción, están bajo control genético (Nederbragt y Lagerwerf, 1986). Existen razas de perros en las que se han identificado alteraciones primarias del metabolismo de Cu, que presentan concentraciones hepáticas por encima de los rangos de referencia ($\leq 400 \mu\text{g/g}$ o mg/kg peso seco (PS) o 100 mg/kg peso húmedo) (Spee et al., 2006), y se han determinado rangos específicos para algunas de éstas. La característica principal observada es la existencia de acumulación de Cu que precede al daño celular y a la inflamación (Thornburg et al., 1990). Además de primaria, puede ser secundaria a enfermedades que producen colestasis, el Cu aumenta su concentración debido a una disminución de la excreción, la magnitud de la acumulación suele ser menor que en las enfermedades primarias y se relaciona a la pérdida de capacidad funcional hepática (Schilsky et al., 2000).

5.2. Cu y daño hepático

El Cu es un elemento esencial que tiene importantes funciones en varios procesos celulares (Linder y Hazegh-Azam, 1996). Es cofactor de enzimas antioxidantes, interviene en la formación de glóbulos rojos, vasos sanguíneos y colágeno, además de participar en la integridad de células nerviosas. El hígado es el órgano principal del metabolismo, almacenamiento, distribución y eliminación de Cu en el organismo.

¹ Adaptado y actualizado de Cedeño Y, Luna D, Miranda M, Suárez M, López-Alonso M. 2016. Enfermedad hepática canina asociada al cobre. *Consulta de Difusión Veterinaria*. 227: 37-44.

Los mecanismos de regulación de la homeostasis del Cu son muy complejos y se dan a nivel de su absorción y su excreción, la cual se produce por vía biliar. Esto se debe a la capacidad del Cu de actuar como un pro-oxidante y causar daño celular por su reactividad (Spee et al., 2006). El Bedlington terrier es un buen ejemplo de la complejidad del metabolismo de Cu, una alteración en el gen COMMD1, produce la falta de una proteína transportadora (ATP7B) para la excreción biliar y es la causa de la acumulación a niveles que pueden alcanzar los 11.000 mg/kg Cu PS. En otras razas las alteraciones del metabolismo de Cu son más complejas y no se han determinado completamente. Recientemente, se ha descrito una alteración en un gen independiente a COMMD1 (ABCA12), que altera el metabolismo del cobre (Haywood et al., 2016). En el Labrador retriever la acumulación puede estar causada por mutaciones en la proteína transportadora ATP7B al igual que el Bedlington terrier pero además en ATP7A, principal importador de Cu en el intestino (Fieten et al., 2016). La susceptibilidad a la acumulación tiene una base genética y la expresión de la enfermedad está dada por factores ambientales como la alimentación (Fieten et al., 2012b). En la **Tabla 3** se describe detalladamente las razas de riesgo y las particularidades de cada una de ellas.

En perros, el Cu puede acumularse por tres mecanismos: (i) debido a un incremento en la absorción a nivel intestinal por ingesta de una dieta con altas concentraciones de Cu, (ii) debido a defectos primarios en su metabolismo (excreción) y (iii) de forma secundaria a enfermedades que afectan el sistema de secreción biliar produciendo colestasis, sobre todo si los animales afectados ingieren altas concentraciones de Cu en la dieta. El incremento en la incidencia de hepatitis crónica por acumulación de Cu observado a partir de 1990 es atribuido al consumo de piensos con fuentes de cobre de mayor biodisponibilidad y un exceso en el contenido total de Cu que estos proveen ya que se ha encontrado un contenido entre 2 a 4 veces mayor al requerimiento mínimo.

Por tanto, las elevadas concentraciones de Cu pueden ser una causa o una consecuencia de enfermedad hepática (Fuentealba y Aburto, 2003). La severidad del daño resultante puede ser debida a la localización subcelular del Cu, al estado de unión a proteínas (efecto protector) y a la concentración del mineral en el hepatocito (Klein et al., 1998). El Cu una vez absorbido a nivel intestinal se acumula a nivel hepático, y en el hepatocito se almacena unido a MT, proteínas de bajo peso molecular con alta afinidad para Cu, en este estado (Cu-MT), el metal no es tóxico para la célula. Cuando la concentración de Cu aumenta, se supera la capacidad de síntesis de MT y se une de forma no selectiva a otras proteínas en el citosol.

Tabla 3. Razas de riesgo a acumulación hepática de Cu.

Razas con alteraciones primarias del metabolismo de Cu					
Raza	Edad presentación	Sexo	Cu mg/kg PS	Patogénesis	Observaciones
Bedlington terrier	< 2 años	M = H	3000-11000	Hereditaria recesiva /Alteración gen COMMD1/Defecto en excreción biliar de Cu	Necrosis hepática aguda y anemia hemolítica 34-66% de incidencia en la raza
West Highland white terrier	3-7 años	M = H	20-2000	Susceptibilidad genética a la acumulación/Hereditabilidad no establecida	El Cu no incrementa con la edad/Concentración máxima a los 6 años
Doberman pinscher	4-7 años	H	1000-2000	Susceptibilidad genética/Excreción biliar disminuida	Hepatitis subclínica común en la raza/Factores inmunomediados relacionados
Labrador retriever	2-10 años	H > M	650-3000	Susceptibilidad genética influenciada por el ambiente/Alta hereditabilidad 0.8	La mayoría de animales afectados también presentan altos niveles de Fe 4117 mg/kg. Animales genéticamente relacionados (Fieten et al., 2013b)
Skye terrier	1-10 años	M = H	800-2200	Alteración de secreción biliar con acumulación subsecuente de Cu	Desarrollo de colestasis. Animales genéticamente relacionados
Dálmata	2-10 años	M = H	754-8390	Susceptibilidad genética influenciada por el ambiente	La mayoría presentan alteraciones GI agudas/ Progresión rápida
Keeshond (Thornburg et al., 1990)	1-17 años	H = M	90-2400	Distribución centrolobular/ Animales genéticamente relacionados	Signos clínicos no reportados

Tabla 3. Razas de riesgo a acumulación hepática de Cu. (continuación)

Otras razas					
Pastor alemán (Thornburg and Rottinghaus, 1985)	3-9 años	M = H	1441-2921	Secundaria a cirrosis	Ascitis, ictericia/Elevación ALT 4x; ALP4x
Anatolian Shepherd (Bosje et al., 2003)	7 años	M	4	Cu distribución centrolobular/Hepatitis crónica	Inapetencia intermitente, Pérdida de peso/ALT3x; ALP 1.5x
Bóxer (van den Ingh and Rothuizen, 1992)	6 años	H (1 caso)	1101	Centrolobular, zona media/Arquitectura hepática normal	PU/PD, ALT y ALP incrementadas
Penbrooke W. Corgi (Rifkin and Miller, 2014)	6 años	H (1 caso)	3530	Fibrosis moderada a severa, gránulos densos de Cu en zonas inflamatorias	PU/PD, pérdida de peso, letargia/Elevación ALT de 7 semanas de duración

Datos tomados de Watson, 2004; Fieten et al., 2012 a,b; Washabau, 2013

Este Cu “libre”, no regulado, se acumula en los diferentes compartimentos celulares, cataliza la reacción fenton que resulta en la formación de radicales hidroxilo que son altamente tóxicos y causan daño oxidativo a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, degeneración y necrosis celular produciendo inflamación, activación de macrófagos y liberación de sustancias pro fibróticas en el tejido hepático, hepatitis crónica y cirrosis.(Kodama et al., 2012).

5.3. Signos clínicos

Los signos clínicos son poco específicos, relacionados al sistema gastrointestinal o de alteración hepática. Muchos perros no presentan sintomatología y pueden parecer asintomáticos durante años hasta que se haya perdido gran parte de la funcionalidad hepática (75%), si bien el Cu puede empezar a acumularse desde etapas muy tempranas (5-6 meses) (Smedley et al., 2009).

Los síntomas más mencionados por los propietarios son anorexia (50%), vómito (48%), PU/PD (47%), letargia (39%), pérdida de peso (28%), ictericia (24%), diarrea (23%) y distensión abdominal (21%) (Favier et al., 2011).

En el Bedlington terrier, se describen tres estadios clínicos de la enfermedad, posteriormente se caracterizó clínicamente la enfermedad en el Labrador retriever, la cual

presenta un curso similar, y se propone que en las razas con desórdenes primarios se presentan tres estadíos clínicos (Hoffmann, 2009a):

- *Estadío 1:* Los niveles de Cu se consideran tóxicos > 400 mg/kg de PS, pero aún no aparece sintomatología clínica ni existe evidencia histológica de daño hepatocelular.
- *Estadío 2:* Se incrementa el nivel de Cu, se observan signos de inflamación a nivel histopatológico, pero no se presentan signos clínicos, aunque puede existir incremento de enzimas hepáticas.
- *Estadío 3:* Hay marcada acumulación de Cu en el hígado, se observan características de inflamación-cirrosis en histopatología y el animal presenta sintomatología asociada (Mandigers et al., 2004).

Enfermedad primaria o secundaria a colestasis

Existen algunos criterios para diferenciar acumulaciones primarias y secundarias, generalmente en las alteraciones primarias las concentraciones de Cu en hígado son superiores a las encontradas en acumulaciones secundarias (Thornburg et al., 1990). En el Bedlington terrier, animales de un año de edad pueden alcanzar concentraciones >1000 mg/kg PS. Los valores superiores a 1000 mg/kg PS soportan el diagnóstico de enfermedad primaria; entre 600-1000 mg/kg PS podrían estar asociadas a alteraciones secundarias, sin embargo, se deberían considerar los cambios histológicos asociados (Strickland et al., 2018).

Otro criterio se basa en la localización de los gránulos de Cu en el tejido hepático, en alteraciones primarias, la acumulación se da a nivel centrolobular (zona 3) mientras que en desórdenes secundarios se localiza en la zona periportal (zona1) aunque cuando existen grandes concentraciones de Cu, el patrón de distribución es difuso (Spee et al., 2006).

5.4. Diagnóstico

5.4.1. Bioquímica sanguínea

La elevación de las enzimas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP), la primera en mayor magnitud a la segunda, es el hallazgo más comúnmente reportado, esto es indicativo de daño hepatocelular, siendo la elevación de ALT el indicador más temprano de la enfermedad (Webster et al., 2019). También se puede evidenciar la pérdida de funcionalidad hepática reflejada en incremento en los tiempos de coagulación, hipoalbuminemia, hipoglucemia, incremento de bilirrubina total y ácidos biliares en estados más avanzados (Webb et al., 2002).

5.4.2. Urianálisis

Una de las alteraciones más comunes que nos orienta de posible afección hepática es la bilirrubinuria. En casos de PU/PD puede haber isostenuria. Se reportaron casos de glucosuria sin hiperglucemia por disfunción tubular renal transitoria (Síndrome de Fanconi), debido al depósito de Cu en el túbulo proximal, en animales con hepatitis asociada al Cu, concretamente en West Highland white terrier (Hill et al., 2008) y en Basenji y Labrador retriever (Langlois et al., 2013). Recientemente se ha descrito en el Labrador retriever que el ratio Cu/Zn en orina está correlacionado a las concentraciones hepáticas de Cu en esta raza. Esto puede ser de utilidad en el diagnóstico y seguimiento terapéutico de la enfermedad en esta raza (Fieten et al., 2013a) y posiblemente una buena alternativa diagnóstica muy práctica a nivel clínico.

5.4.3. Diagnóstico por la imagen

Radiología

Los hallazgos radiológicos no son específicos de enfermedad hepática crónica, pueden presentarse cambios en el tamaño del órgano sobre todo en casos terminales de cirrosis.

Ecografía

La ecografía es una técnica de diagnóstico muy apropiada y muy utilizada para el diagnóstico de la enfermedad hepática. Es útil para excluir otras enfermedades de sintomatología similar o enfermedades del tracto biliar como obstrucción biliar extrahepática. Puede proporcionar información de la duración de la enfermedad, basada en características como: disminución del tamaño hepático, ecogenicidad aumentada o mixta, lesiones nodulares o presencia de bordes angulados sugerentes de cronicidad. Es útil también para detectar lesiones focales o difusas o presencia de líquido abdominal que representa información importante antes de tomar muestras de biopsia. Y por supuesto es muy útil como guía para la toma de biopsias.

5.4.4. Diagnóstico definitivo

Los hallazgos clínicos, bioquímicos o de imagen no son específicos de hepatopatía por acumulación de Cu y son similares a los encontrados en animales con hepatitis crónica idiopática o de otras causas.

El diagnóstico temprano de la enfermedad permite el inicio de la terapia antes de que se presenten cambios irreversibles en el parénquima hepático. En general, se recomienda que todo animal que presenta elevación de ALT 2x de forma sostenida en el tiempo, y en los cuales se han descartado enfermedades extra hepáticas que producen elevación de esta enzima, debería evaluarse más profundamente y buscar la causa, sobre todo en razas

predispuestas a hepatitis crónica, mediante toma de muestras de biopsia y evaluación histopatológica (Dirksen and Fieten, 2017).

El diagnóstico definitivo se realiza en base a la evaluación histopatológica y a la determinación de la concentración hepática de Cu (Webster et al., 2019).

El requerimiento mínimo para evaluar el tejido hepático y determinar la concentración de Cu es tomar dos o tres muestras mediante biopsia ecoguiada (tru-cut), recomendándose calibres de 14 G para perros grandes o 16 G para perros pequeños. Es necesaria la observación de 12 a 15 triadas portales para realizar un análisis morfológico más preciso, esto se relaciona directamente con el tamaño de la muestra obtenida. Se recomienda que la muestra sea de 2 cm de longitud o 1 cm como mínimo y se debe evitar que ésta se fraccione (Webster et al., 2019).

Es importante recalcar la evaluación del perfil de coagulación del paciente previo a la obtención de las muestras; análisis del tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina activada (TPPA) (Elevación 1.5x), fibrinógeno (<1g/L), conteo plaquetario (<50.000/ μ L), tiempo de sangrado de mucosa bucal (>5 minutos) son indicadores de que el animal tiene un alto riesgo de sangrado; estas deben realizarse antes de la toma de muestra (máximo 24 horas) (Webster et al., 2019).

Evaluación histológica

La hepatitis crónica es un diagnóstico histopatológico caracterizado por apoptosis o necrosis hepatocelular, inflamación linfocítica, plasmocítica o granulomatosa de localización portal, multifocal, zonal o panlobular y fibrosis portal-portal o portal- central con distorsión de la arquitectura lobular. La inflamación usualmente se origina en la región portal (Webster et al., 2019). La proporción y distribución de estos componentes varían dependiendo del estadio de la enfermedad, así mismo el grado de actividad de la enfermedad está dado por el grado de inflamación y la extensión de apoptosis hepatocelular y necrosis. Las fases y el pronóstico están relacionados con la extensión y el patrón de fibrosis y pérdida de arquitectura del tejido (van den Ingh et al., 2007). En hepatitis crónica asociada al Cu se observan signos de inflamación con presencia de gránulos intracitoplasmáticos centrolobulares o periportales, con acumulación progresiva del Cu retenido en macrófagos formando pequeños agregados.

Determinación de la concentración hepática de Cu

- La determinación cuantitativa de Cu en hígado se puede realizar mediante análisis de activación de electrones, análisis de absorción atómica y actualmente por espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS) que requiere de muestras frescas o congeladas de unos 0.5 gramos.

- La determinación histoquímica en tejido hepático es un método semicuantitativo que detecta Cu cuando existen concentraciones >400 mg/kg, se pueden usar tinciones como rodanina y ácido rubeánico, este último permite observar al Cu como gránulos de color azul oscuro o negro (Thornburg et al., 1985). Existe un sistema de graduación para determinación semicuantitativa de Cu en las preparaciones histoquímicas con rodanina y ácido rubeánico, va de 0 a 5, siendo 0 ausencia de Cu y 5 presencia de gránulos de Cu distribuidos en forma difusa en el lóbulo asociado a células fagocitarias. Una graduación de 2+ es considerado anormal.

Para el Bedlington terrier existe una prueba genética desarrollada por Veterinary Genetic Services (VetGen.com) que determina animales enfermos, portadores, o sanos (homocigótico normal) con un 90% de precisión, que se puede realizar desde 6 a 10 semanas de edad. Actualmente, la incidencia de hepatitis por acumulación de Cu en esta raza es muy baja, existe una prueba genética para el Labrador retriever, sin embargo no hay aún información suficiente sobre las recomendaciones para el uso de esta prueba (Webster et al., 2019).

5.5. Tratamiento

El tratamiento está orientado a producir un balance negativo de Cu en el organismo y reducir los niveles en el hígado, por disminución de la ingesta o absorción, o promoviendo la movilización y excreción de Cu.

5.5.1. Manejo Nutricional

El contenido de Cu en dietas comerciales está entre 12-16 mg/kg de materia seca (MS), estos niveles se alcanzan mediante suplementación, y en general sobrepasan la cantidad diaria recomendada por la NRC para perros (6 mg/kg MS o 0.06 mg de Cu/kg de peso corporal) (Johnston et al., 2013), aunque depende de la biodisponibilidad del mineral en la dieta. La absorción de Cu en el alimento se incrementa por altas concentraciones de proteína y aminoácidos, y cantidades reducidas de Zn, ascorbato y fibra. La acumulación de Cu en el hígado de perros asociada a la alimentación ha sido evaluado en animales con predisposición genética a la retención de Cu y se ha establecido como factor de riesgo para desarrollo de hepatitis (Fieten et al., 2012a), es por ello que es muy importante un correcto manejo nutricional.

La administración de dietas bajas en Cu puede ser efectiva como tratamiento preventivo para animales de razas predispuestas a acumulación de Cu o como tratamiento a largo plazo de animales enfermos después de la terapia de quelación. En el Labrador Retriever

hay evidencia de disminución de la progresión de la enfermedad y grado de inflamación hepática con restricción de Cu en la dieta (Hoffmann et al., 2009b). Los alimentos comerciales de prescripción para animales con hepatopatías tienen niveles reducidos de Cu (3-5 mg/kg; <0.12mg/100Kcal), altos niveles de Zn (120–200 mg/kg) y vitaminas del complejo B, moderada restricción de sodio, moderada en grasa y alta en hidratos de carbono y suplementada con antioxidantes. Los valores de proteína son reducidos y están entre el 14 y 15% y puede ser necesaria la suplementación de una fuente de proteína en concreto (ej.: queso cottage) para animales en crecimiento (Honeckman, 2003). En animales que consumen dietas caseras se debe evitar alimentos como vísceras, carne, setas, nueces y huevo.

Zinc

Las sales de Zn son efectivas para prevenir la acumulación hepática de Cu además de tener propiedades antifibróticas y hepatoprotectoras, los iones de Zn inducen síntesis de MT en el enterocito, las cuales se unen al Cu e impiden su absorción, siendo eliminado por las heces. Puede ser útil en casos en donde los niveles de Cu hepático son moderadamente elevados (entre 400-900 mg/kg MS), no debe ser usado como única terapia en animales con hepatitis severa debido a la acumulación de Cu ya que se requieren varias semanas para reducir su absorción. Se recomienda el uso de gluconato o acetato de Zn ya que son mejor tolerados que el sulfato. El Zn puede producir irritación gástrica y vómitos. Puede ser administrado con pequeñas cantidades de comida, pero lo recomendable es que se de una hora antes del alimento; la dosis de inducción es de 15 mg/kg cada 12 horas, después de 1 a 3 meses la dosis puede ser reducida a la mitad. Lo ideal es mantener concentraciones séricas de Zn entre 2–4 mg/L (el rango normal en suero es de 0.9–1.2 mg/L). El Zn no debe ser administrado con D-penicilamina ya que disminuye la efectividad de los dos productos (Brewer et al., 1992).

5.5.2. Terapia de quelación

D-penicilamina

La D-penicilamina es un producto de la degradación de la penicilina con capacidad de unirse al Cu y a otros metales. Promueve la movilización de Cu de los tejidos y su excreción urinaria, también puede inducir la formación de MT, es antifibrótico (disminuye la deposición de colágeno en hígado) y tiene efectos inmunosupresores e inmunomoduladores. Actualmente, es el tratamiento de elección para disminución de la acumulación hepática de cobre en perros.

La dosis indicada de tratamiento es de 10-15 mg/kg vía oral (PO) cada 12 horas. Los efectos adversos observados en perros son anorexia, vómito y diarrea, estos efectos se disminuyen dividiendo la dosis en varias tomas a lo largo del día, sin embargo, se recomienda

administrar 30 minutos antes o dos horas después de la comida. Su uso continuado a largo plazo puede producir deficiencia iatrogénica de Cu evidenciada por anemia microcítica, además puede reducir los niveles de Zn y piridoxina (Fieten et al., 2013a). No debería utilizarse sin determinación previa de Cu hepático y estudio histopatológico. Se recomienda su uso en animales con niveles hepáticos de Cu en torno a 1000 mg/kg, o con concentraciones menores con evidencia de daño hepatocelular. La duración del tratamiento está relacionada a la cantidad inicial de Cu en el hígado. La reducción no sigue un patrón lineal entre animales. Igualmente, el período y la frecuencia de monitorización dependen del estadio de la enfermedad y la cantidad de Cu acumulada. Se recomienda revisar entre 3 y 6 meses con determinación de enzimas hepáticas, ácidos biliares, albúmina, hemograma y realizar una biopsia anual (Fieten et al., 2014a). La normalización de los niveles de ALT es indicativa de reducción de cobre hepático, y se debe administrar D-penicilamina hasta un mes después de que los valores de ALT estén en el rango normal. En algunos animales puede requerirse terapia de por vida, a razón de 2 -3 veces/semana con 50% dosis (Webster et al., 2019). En Doberman pinscher con hepatitis subclínica se describe una reducción de 1036 mg/kg a 407 mg/kg tras 4 meses de tratamiento (Mandigers et al., 2004). En el West Highland white terrier, el tratamiento con D-penicilamina se recomienda con concentraciones de Cu en hígado >2000 mg/kg, con evidencia de hepatitis crónica y cirrosis. Animales adultos con hepatitis crónica y concentraciones hepáticas de Cu por debajo de ésta, pueden no requerir terapia de quelación ya que en esta raza el Cu no aumenta con la edad, se puede considerar un manejo nutricional y terapia combinada de Zn y glucocorticoides (Thornburg et al., 1986).

Los casos de acumulación secundaria de Cu por colestasis tienen una respuesta más rápida al tratamiento, el cual debe continuarse hasta alcanzar los valores normales de Cu en hígado, luego de esto el protocolo se puede cambiar a terapia nutricional y suplementación con Zn (Fieten et al., 2013a).

Trientina

Es un quelante selectivo de Cu (II) efectivo en la disminución de Cu hepático. Es utilizado en animales que no toleran el tratamiento con D-penicilamina. Favorece la excreción urinaria de Cu y también impide la absorción intestinal. La dosis indicada de tratamiento es de 10-15 mg/kg PO cada 12 horas una hora antes del alimento. Los efectos terapéuticos se alcanzan más rápidamente que con D-penicilamina y se ha utilizado en cuadros agudos de toxicosis por Cu (Aaseth et al., 2014).

Antioxidantes

El uso de antioxidantes está orientado a mejorar los mecanismos de protección contra el estrés oxidativo mediados por glutatión, el cuál disminuye en enfermedades hepáticas

inflamatorias y de retención de Cu entre otras (Center et al., 2002). Estos productos están siempre indicados para mejorar la funcionalidad hepática. En la Tabla 2 se describen los principales antioxidantes empleados en hepatopatías por Cu.

5.6. El perro como modelo de intoxicación por Cu

El perro, como animal de compañía comparte el medio ambiente con el ser humano y presenta muchas similitudes en cuanto a enfermedades que se observan en las dos especies. La enfermedad hepática por alteraciones en el metabolismo del Cu es una de éstas (Fieten et al., 2014a). La toxicosis por Cu del Bedlington terrier es semejante genéticamente a la enfermedad de Wilson en seres humanos, en donde una alteración en el gen ATP7B produce acumulación de Cu y daño hepático, aunque clínicamente presenta diferencias con el perro. Los genes involucrados en el metabolismo del Cu están altamente conservados entre las diferentes especies y el perro, en especial de raza pura, es ideal para estudios de mapeo genético que aportan conocimientos sobre las funciones de estos genes. Los trastornos ecogenéticos del metabolismo de Cu en seres humanos como la “Cirrosis Infantil de la India” y la “Toxicosis Idiopática por Cu” entre otras, son similares fenotípicamente a la descrita en el Labrador retriever (Hoffmann et al., 2009b). El perro como modelo animal de enfermedad hepática permite realizar seguimientos a largo plazo, en un tiempo mayor a otros modelos animales como los roedores, por lo que el conocimiento que aporta el perro acerca de la fisiopatología de estas afecciones y también sobre nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento beneficiarían a las dos especie (Fieten et al. 2014a).

6. MINERALES EN ALIMENTO COMERCIAL PARA PERROS

Para la mayoría de los perros y gatos su alimentación diaria consiste en una sola comida "completa y equilibrada". Como no hay grandes variaciones en los ingredientes, a diferencia de una dieta humana típica, la alimentación prolongada con la misma dieta puede causar serios problemas fisiológicos y metabólicos si no está bien equilibrada. Un ejemplo de ello pueden ser los minerales que de forma rutinaria se incorporan a sus dietas.

Si bien la industria de la alimentación de mascotas surgió en la década de los 40, no fue hasta los años 70 cuando se empezó a trabajar en la regulación y el desarrollo de guías nutricionales específicas para perros y gatos en los Estados Unidos con la creación del National Research Council (NRC), quien estableció las primeras recomendaciones sobre requerimientos nutricionales para perros y gatos. Tiempo después con la creación de AAFCO (Association of American Feed Control Officials) se desarrollaron recomendaciones prácticas para uso de las empresas que elaboran los piensos (Dzanis, 2008).

La atención a los niveles minerales en las dietas comerciales tomó importancia debido al reconocimiento en los 90s de algunas patologías asociadas con la alimentación (Gagné et al., 2013), como por ejemplo el hipertiroidismo felino y los niveles de yodo (I) en la dieta (Opreanu and Codreanu, 2018), displasia de cadera en perros de raza grande debido a exceso de Ca y energía en la dieta en fase de crecimiento (Lauten et al., 2002), dermatopatías por deficiencia de Zn (Colombini, 1999), hepatopatía por acumulación de Cu (Fieten et al, 2012), entre otras. Debido a esto se han realizado en el transcurso del tiempo, modificaciones en las guías nutricionales.

En la Unión Europea la industria de la alimentación de mascotas está estrictamente regulada por varios estamentos, incluyendo el Consejo, el Parlamento y la Comisión Europea. Estas entidades emiten normativas regulatorias para plantas de fabricación, etiquetado e información al consumidor, materia prima de origen animal y vegetal, uso de aditivos, medidas sanitarias para el manejo y procesamiento de productos cárnicos y métodos de análisis del producto final. La FEDIAF, European Pet Food Industry Federation, ha desarrollado guías nutricionales en base a recomendaciones del Scientific Advisory Board (SAB), organismo conformado por expertos europeos que tienen en cuenta a su vez las recomendaciones de AAFCO y NRC. En relación a la composición mineral en la dieta y a los requerimientos nutricionales la FEDIAF provee recomendaciones de los niveles mínimos y máximos que debe contener un alimento balanceado comercial para asegurar una nutrición adecuada y segura para cada etapa fisiológica en animales sanos. Sin embargo, es importante señalar que las recomendaciones no están enfocadas en prevenir patologías crónicas o tratar animales que las padezcan (Butterwick et al., 2011).

Para los aditivos utilizados como elementos traza existe el límite máximo legal que consta en el registro de aditivos alimentarios de la regulación 1831/2003/EC del Parlamento y el Consejo Europeo (FEDIAF, 2012) y es aplicable a todas las etapas de la vida. El límite máximo solo es aplicado cuando el elemento traza es añadido a la dieta como aditivo y se refiere a la cantidad total del mineral presente en el producto terminado proveniente de los ingredientes de la dieta más el aditivo. Si el nutriente proviene sólo de los ingredientes, el máximo legal no aplica y en su lugar se habla de máximo nutricional (FEDIAF, 2012).

También hay que tener en cuenta que los minerales traza provienen de fuentes de extracción mineral. Esto hace que la seguridad y la trazabilidad deban ser parte del proceso de garantía de calidad para evitar la presencia de metales pesados que, si están presentes en una dieta, pueden ser perjudiciales para la salud a largo plazo de perros y gatos, especialmente a medida que ha aumentado su vida útil.

Antes de salir al mercado los alimentos balanceados son analizados en cuanto a su contenido de Ca, P, Mg, Cl, K, Na, Cu, Fe, Mn, Se, I y Zn (FEDIAF, 2012).

Para poder interpretar los aportes minerales de las dietas es necesario clarificar una serie de conceptos nutricionales:

- **Requerimiento nutricional:** Es la cantidad mínima que se debe proveer al animal para cubrir sus necesidades metabólicas, es decir el nivel mínimo de ingesta.
- La NRC en su última edición en 2006 (NRC, 2006), además del requerimiento nutricional mínimo usa los términos de *ingesta adecuada* y *disponibilidad recomendada*. El término de **ingesta adecuada** se utiliza cuando no se conoce el requerimiento mínimo de un mineral y el valor dado en la tabla refleja una cantidad de ese nutriente que o bien ha sido dada a un animal sin producir signos de deficiencia, o se ha establecido en base a datos en otras especies, hasta cierto punto de forma arbitraria. La **disponibilidad recomendada** se refiere a la concentración del nutriente en la dieta formulada, necesaria para cubrir la necesidad del animal en un estado fisiológico dado, tomando en consideración las variaciones naturales en la biodisponibilidad del nutriente en la materia prima usada en la elaboración del alimento (Butterwick et al., 2011).
- **Nivel mínimo recomendado:** Contempla el requerimiento nutricional de un elemento e incluye un margen de seguridad para prevenir deficiencias debido a variaciones individuales del propio animal, así como a interacciones nutricionales. A la hora de formular un alimento completo no se debe usar el requerimiento mínimo sino el nivel mínimo recomendado (FEDIAF, 2012).
- **Nivel máximo nutricional:** Es la cantidad máxima de un elemento en un alimento, balanceado y completo que, en base a datos científicos, no ha sido asociado a efectos

adversos en animales sanos. Para ciertos minerales un nivel superior puede ser seguro, pero no existe información suficiente al respecto (FEDIAF, 2012).

Las tablas proveen valores mínimos y máximos para facilitar la formulación de los alimentos comerciales y están orientadas a mantenimiento de la salud y evitar enfermedades asociadas a la nutrición. En etapas de crecimiento, animales adultos, en gestación y lactación.

Las tablas de recomendación están expresadas en base a la cantidad de materia seca (MS) del alimento o en base a su contenido energético. La expresión del requerimiento nutricional en base a la energía metabolizable (EM) de la dieta permite establecer de manera más clara las cantidades consumidas por el animal, ya que la ingesta de alimento se determina por su densidad energética, por tanto, si está expresado en base a la MS, es necesario conocer la densidad energética de la dieta, para establecer el consumo real de un nutriente en un animal.

Tabla 4. Requerimiento nutricional de minerales en caninos adultos mantenimiento.

Elemento (cant/1000KcalEM)	AAFCO, 2014	NRC 2006	FEDIAF 2011	
	Mínimo Recomendado	Recomendado	Recomendado	Máximo (g/100gMS)
Calcio (g)	1.25	1	1.45	2.5 N*
Fósforo (g)	1	0.75	1.16	1.6N*
Relación Ca/P	1:01		1:01	2:1N*
Potasio (g)	1.5	1	1.45	-
Sodio (g)	0.2	0.2	0.29	-
Cloro (g)	0.3	0.3	0.43	-
Magnesio (g)	0.15	0.15	0.2	-
Cobre (mg)	1.83	1.5	2.08	2.8 L**
Zinc (mg)	20	15	20.8	28.4 L**
Manganeso (mg)	1.25	1.2	1.67	17 L**
Hierro (mg)	10	7.5	10.4	142 L**
Selenio (mg)	0.08	0.088	0.087	56.8 L**
Yodo (mg)	0.25	0.22	0.3	1.1 L**

*Máximo Nutricional. **Máximo Legal.

Tabla 5. Requerimiento nutricional de minerales en caninos en crecimiento.

Elemento (cant/1000KcalEM)	AAFCO, 2014	NRC 2006	FEDIAF 2011	
	Mínimo Recomendado	Recomendado	Recomendado	Máximo (g/100gMS)
Calcio (g)	3	3	2	1.8N*
Fósforo (g)	2.5	2.5	1.75	1.6N*
Relación Ca/P	1-.1		1:01	1.8/1
Potasio(g)	1.5	1.1	1.1	-
Sodio(g)	0.8	0.55	0.55	-
Cloro(g)	1.1	0.72	0.83	-
Magnesio(g)	0.1	0.1	0.1	-
Cobre (mg)	3.1	2.7	2.75	2.8 L**
Zinc (mg)	5	25	25	28.4 L**
Manganeso(mg)	1.8	1.4	1.4	17 L**
Hierro (mg)	22	22	22	142 L**
Selenio (mg)	0.09	0.0875	0.1	56.8 L**
Yodo (mg)	0.25	0.22	0.15	1.1 L**

*Máximo Nutricional. **Máximo Legal.

En relación a los microminerales, las recomendaciones de la NRC están basadas en investigaciones con dietas purificadas o fuentes minerales de muy alta digestibilidad que no son de uso práctico en la elaboración de dietas comerciales para perros y gatos, esto puede explicar que los niveles recomendados por AAFCO y FEDIAF sean mayores a los de la NRC (Dzanis, 1994), así mismo los valores expresados en las tablas de FEDIAF son 20% más altos que los de NRC 2006 para compensar la disminución de la ingesta por un menor requerimiento energético de los perros domésticos reportada por la NRC. La FEDIAF es la única entidad que establece valor máximo legal para microelementos y estos son expresados en g/100g MS para todas las etapas de vida (FEDIAF, 2012).

Para algunos elementos como el Fe, los niveles máximos seguros no están bien establecidos, no se han reportado patologías asociadas a toxicosis por Fe en caninos, en general los animales son más resistentes a la intoxicación que el ser humano (Dzanis, 2008), la NRC no ha reportado niveles máximos de este elemento, FEDIAF y AAFCO sí.

6.1. Variaciones en los requerimientos nutricionales

La evolución de las dietas, composición, ingredientes, disponibilidad de fuentes de minerales empleadas, así como el mejor conocimiento de la fisiología animal, ha hecho que los requerimientos minerales hayan variado a lo largo del tiempo. Por su importancia en la enfermedad hepática canina, y por ser la enfermedad asociada a elementos esenciales con más entidad en el perro vamos a exponer el ejemplo del Cu, como ha evolucionado en los últimos años los requerimientos nutricionales de este mineral.

En 1985 el NRC recomendaba 0.8 mg de Cu/1000Kcal EM en dietas para perros basándose en estudios realizados en 1939 en perros anémicos que mostraba mejoría clínica tras la administración de 0.15 mg de Cu/kg de peso corporal (Frost et al., 1939). En 2006 la concentración de Cu recomendada pasó a ser 1.5 mg de Cu/1000Kcal EM (NRC, 2006). Extrapolando la información del requerimiento mineral en hembras gestantes y en lactación para el desarrollo de camadas saludables (Meyer, 1984); para cachorros en crecimiento se recomienda 2.5 mg/1000 Kcal EM (asumiendo una biodisponibilidad del 30%) con lo que se deberían aportar 0.1 mg Cu/kg de peso corporal. Por el momento no se establece un límite máximo seguro (NRC, 2006).

Dado que en los ingredientes más utilizados en la elaboración de alimento para perros las concentraciones de Cu son bajas, este elemento se suplementa de forma rutinaria como aditivo. A finales de la década de los 90 el óxido de Cu, hasta ese momento la fuente habitual de Cu para alimento comercial de perros y gatos, se remplazó por fuentes más solubles y de mayor biodisponibilidad como el sulfato de Cu o compuestos orgánicos combinados con Cu (Fascetti et al., 1998). Esto podría explicar que entre 1990 y 1997, al analizar muestras de biopsias hepáticas de perros con hepatitis crónica se determinó que el 55% tenían niveles de cobre $\geq 400\mu\text{g/g PS}$, considerados anormales; posteriormente este porcentaje se incrementó hasta el 72%. Y en muestras de animales sanos el porcentaje subió de 17% en 1990 al 22% entre 1998–2009 (Johnston et al., 2013). Existe una correlación positiva entre el contenido de Cu en el hígado y en el alimento y una correlación negativa entre el contenido de Cu en hígado y los niveles de Zn en la dieta. Se estima un incremento de 14.2% en el contenido de Cu en el hígado por cada 1mg/1000kcal de Cu en la dieta y por cada 1 mg/1000kcal de reducción de Zn en la dieta con respecto a los niveles recomendados existe un incremento de 1.5% de Cu en hígado en perros Labrador retriever, raza con predisposición a la hepatopatía por acumulación de Cu (Fieten et al., 2012).

Tabla 6. Variaciones en el requerimiento nutricional de minerales en caninos adultos mantenimiento

Elemento (cant/1000Kcal EM)	AAFCO		NRC 2006	FEDIAF 2011	
	2008	2014			
	Recomendado	Máx.	Recomendado	Recomendado	Max (g/100gMS)
Calcio (g)	1.7	7.1	1.25	1	2.5 N*
Fósforo (g)	1.4	4.6	1	0.75	1.6 N*
Cobre (mg)	2.1	71	1.83	1.5	2.8 L**
Zinc (mg)	34	286	20	15	28.4 L**
Manganeso (mg)	1.4	ND	1.25	1.2	17 L**
Hierro (mg)	23	857	10	7.5	142 L**
Selenio (mg)	0.03	0.57	0.08	0.088	56.8 L

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAFCO. 2014. AAFCO methods for substantiating nutritional adequacy of dog and cat food. AAFCO Dog Cat Food Nutr. Profiles 1–24.
- Aaseth, J., M.A. Skaug, Y. Cao, and O. Andersen. 2015. Chelation in metal intoxication-Principles and paradigms. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 31:260–266. doi:10.1016/j.jtemb.2014.10.001.
- Abdel-Razik, A., N. Mousa, D. Elhammady, R. Elhelaly, R. Elzehery, S. Elbaz, M. Eissa, N. El-Wakeel, and W. Eldars. 2016. Ascitic fluid calprotectin and serum procalcitonin as accurate diagnostic markers for spontaneous bacterial peritonitis. *Gut Liver* 10:624.
- Adamse, P., H.J. (Ine. Van der Fels-Klerx, and J. de Jong. 2017. Cadmium, lead, mercury and arsenic in animal feed and feed materials—trend analysis of monitoring results. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 34:1298–1311. doi:10.1080/19440049.2017.1300686.
- Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). 2012. Toxicological Profile for Cadmium. Accessed. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>.
- Akçil, E., G. Yavuz, and M. Koçak. 2003. Effects of inflammation and anti-inflammatory treatment on serum trace elements concentrations. *Biol. Trace Elem. Res.* 93:95–103.
- Al-Saleh, E., M. Nandakumaran, M. Al-Shammari, and A. Al-Harouny. 2004. Maternal–fetal status of copper, iron, molybdenum, selenium and zinc in patients with gestational diabetes. *J. Matern. Neonatal Med.* 16:15–21.
- Alborough, R., L. Grau-Roma, S. de Brot, G. Hantke, S. Vazquez, and D.S. Gardner. 2020. Renal accumulation of prooxidant mineral elements and CKD in domestic cats. *Sci. Rep.* 10:3160. doi:10.1038/s41598-020-59876-6.

- Ameri, M. 2005. Textbook of Veterinary Physiological Chemistry. *Vet. Clin. Pathol.* 34:270–270. doi:10.1111/j.1939-165x.2005.tb00053.x.
- Appleton, D.J., J.S. Rand, G.D. Sunvold, and J. Priest. 2002. Dietary chromium tripicolinate supplementation reduces glucose concentrations and improves glucose tolerance in normal-weight cats. *J. Feline Med. Surg.* 4:13–25.
- Arredondo, M., G. Weisstaub, M. Medina, M. Suazo, M. Guzmán, and M. Araya. 2014. Assessing chaperone for Zn, Cu-superoxide dismutase as an indicator of copper deficiency in malnourished children. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 28:23–27. doi:10.1016/j.jtemb.2013.10.004.
- Askar, T.K., B. Salmanoglu, R. Salmanoglu, N. Erkal, and A. Beskaya. 2009. Changes in the oxidative status and serum trace element levels in dogs with mammary tumours. *Acta Vet. Brno.* 59:405–411. doi:10.2298/AVB0904405A.
- Avila, D.S., R.L. Puntel, and M. Aschner. 2013. Manganese in health and disease. Springer.
- Badea, E., G.V. Goran, C. ȚOCA, and V. Crivineanu. 2018. Assessment of heavy metal and mineral levels in hair samples from dogs with mammary neoplasms. *Bull UASVM Food Sci Technol* 75.
- Bampidis, V.A., E. Nistor, and D. Nitas. 2013. Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury as Undesirable Substances in Animal Feeds. *Anim. Sci. Biotechnol.* 46:17–22.
- Barbier, O., G. Jacquillet, M. Tauc, M. Cougnon, and P. Poujeol. 2005. Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiol.* 99:p105–p110.
- Barceloux, D.G., and D. Barceloux. 1999. Molybdenum. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37:231–237.
- Battersby, I.A., U. Giger, and E.J. Hall. 2005. Hyperammonaemic encephalopathy secondary to selective cobalamin deficiency in a juvenile Border collie. *J. Small Anim. Pract.* 46:339–344.
- Beguin, Y., J. Maertens, B. De Prijck, R. Schots, L. Seidel, C. Bonnet, K. Hafraoui, E. Willems, G. Vanstraelen, and S. Servais. 2013. Darbepoetin-alfa and intravenous iron administration after autologous hematopoietic stem cell transplantation: A prospective multicenter randomized trial. *Am. J. Hematol.* 88:990–996.
- Beigh, S.A., R. Iqbal, A.M. Bhat, and A. Ishfaq. 2017. Management of zinc responsive dermatitis in dogs 5:2569–2571.
- Benson, D.A., K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, and E.W. Sayers. 2015. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 43:D30.
- Berny, P.J., L.M. Cote, and W.B. Buck. 1992. Case reports of lead poisoning in dogs from the National Animal Poison Control Center and the Centre National D'Informations Toxicologiques, Veterinaires: anecdotes or reality?. *Vet. Hum. Toxicol.* 34:26–31.
- Bertinato, J., and M.R. L'Abbé. 2004. Maintaining copper homeostasis: Regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *J. Nutr. Biochem.* 15:316–322. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.02.004.
- Bikker, P., J. van Baal, H. van Diepen, G. Binnendijk, L. Troquet, and A.W. Jongbloed. 2014. Effect of level and duration of copper supplementation of pig diets. *Trace Elem. Man Anim.* 15 9.
- Bleys, J., A. Navas-Acien, and E. Guallar. 2007. Serum selenium and diabetes in US adults. *Diabetes Care* 30:829–834.
- Bosje, J.T., T. Van den Ingh, J. Rothuizen, and A. Fennema. 2003. Copper-induced hepatitis in an Anatolian shepherd dog. *Vet. Rec.* 152:84–85.

- Bremner, I., and J.H. Beattie. 1995. Copper and zinc metabolism in health and disease: speciation and interactions. *Proc. Nutr. Soc.* 54:489–499. doi:10.1079/PNS19950017.
- Brewer, G. 2003. Copper in medicine. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7:207–212. doi:10.1016/S1367-5931(03)00018-8.
- Brewer, G.J., R.D. Dick, W. Schall, V. Yuzbasiyan-Gurkan, T.P. Mullaney, C. Pace, J. Lindgren, M. Thomas, and G. Padgett. 1992. Use of zinc acetate to treat copper toxicosis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201:564–568.
- Van den Broek, A.H.M., and W.L. Stafford. 1988. Diagnostic value of zinc concentrations in serum, leucocytes and hair of dogs with zinc-responsive dermatosis. *Res. Vet. Sci.* 44:41–44.
- Btaiche, I.F., P.L. Carver, and K.B. Welch. 2011. Dosing and monitoring of trace elements in long-term home parenteral nutrition patients. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 35:736–747.
- Butterwick, R.F., J.W. Erdman, R.C. Hill, A.J. Lewis, and C.T. Whittemore. 2011. Challenges in developing nutrient guidelines for companion animals. *Br. J. Nutr.* 106:S24–S31. doi:10.1017/S000711451100184X.
- Camakaris, J., I. Voskoboinik, and J.F. Mercer. 1999. Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261:225–32. doi:10.1006/bbrc.1999.1073.
- Carver, P.L. 2013. Metal ions and infectious diseases. An overview from the clinic. Springer.
- Cedeño, Y., M. López-Alonso, and M. Miranda. 2016. Hepatic concentrations of copper and other metals in dogs with and without chronic hepatitis. *J. Small Anim. Pract.* 57:703–709. doi:10.1111/jsap.12591.
- Center, S.A., K.L. Warner, and H.N. Erb. 2002. Liver glutathione concentrations in dogs and cats with naturally occurring liver disease. *Am. J. Vet. Res.* 63:1187–1197. doi:10.2460/ajvr.2002.63.1187.
- Charbonneau, S.M., G.K.H. Tam, F. Bryce, Z. Zawidzka, and E. Sandi. 1979. Metabolism of orally administered inorganic arsenic in the dog. *Toxicol. Lett.* 3:107–113.
- Chen, S., X. Jin, Z. Shan, S. Li, J. Yin, T. Sun, C. Luo, W. Yang, P. Yao, K. Yu, Y. Zhang, Q. Cheng, J. Cheng, W. Bao, and L. Liu. 2017. Inverse association of plasma chromium levels with newly diagnosed type 2 diabetes: A case-control study. *Nutrients* 9:1–10. doi:10.3390/nu9030294.
- Chen, X., G. Yang, W.Y. Ding, F. Bondoc, S.K. Curtis, and C.S. Yang. 1999. An esophagogastrroduodenal anastomosis model for esophageal adenocarcinogenesis in rats and enhancement by iron overload. *Carcinogenesis* 20:1801–1808.
- Chikazawa, S., T. Nakazawa, Y. Hori, F. Hoshi, K. Kanai, N. Ito, K. Orino, K. Watanabe, and S. Higuchi. 2013. Change in serum ferritin concentration in experimentally induced anemia of chronic inflammation in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 75:1419–1426. doi:10.1292/jvms.13-0149.
- Clarkson, T. 1995. Health effects of metals: A role for evolution?. *Environ. Health Perspect.* 103:9–12. doi:10.1289/ehp.95103s19.
- Cohen, M., B. Kargacin, and M. Klein. 1993. Costa M. Mechanism of chromium carcinogenicity. *Crit Rev Toxicol* 23:255–281.
- Cole, G., J. Weigel, A. Headrick, W. Adams, and J. Biskup. 2015. Multiple pathological fractures and delayed union associated with lead exposure in a German Shepherd Dog. *Aust. Vet. J.* 93:373–376. doi:10.1111/avj.12361.

- Collins, J.F. 2016. *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*. Academic Press.
- Colombini, S. 1999. Canine zinc-responsive dermatosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 29:1373–1383.
- Costello, L.C., and R.B. Franklin. 2016. A comprehensive review of the role of zinc in normal prostate function and metabolism; and its implications in prostate cancer. *Arch. Biochem. Biophys.* 611:100–112.
- Cousins, R.J., J.P. Liuzzi, and L.A. Lichten. 2006. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J. Biol. Chem.* 281:24085–24089. doi:10.1074/jbc.R600011200.
- Cummings, J.E., and J.P. Kovacic. 2009. The ubiquitous role of zinc in health and disease. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)*. 19:215–240. doi:10.1111/j.1476-4431.2009.00418.x.
- Curran, J.E., J.B.M. Jowett, K.S. Elliott, Y. Gao, K. Gluschenko, J. Wang, D.M.A. Azim, G. Cai, M.C. Mahaney, and A.G. Comuzzie. 2005. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nat. Genet.* 37:1234–1241.
- Dandrieux, J.R.S., P.J.M. Noble, L.J. Halladay, L. Mclean, and A.J. German. 2013. Canine breed predispositions for marked hypcobalaminaemia or decreased folate concentration assessed by a laboratory survey. *J. Small Anim. Pract.* 54:143–148. doi:10.1111/jsap.12039.
- Dash, S.K., C. Singh, and G. Singh. 2018. Mineral status in female dogs with malignant mammary gland tumors fed with different habitual diets. *Explor. Anim. Med. Res.* 8:59–63.
- Davenport, A. 2015. *Trace Elements in Patients with Chronic Kidney Disease*. Elsevier Inc.
- DiDonato, M., and B. Sarkar. 1997. Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1360:3–16. doi:10.1016/S0925-4439(96)00064-6.
- Dirksen, K., and H. Fieten. 2017. Canine Copper-Associated Hepatitis. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 47:631–644. doi:10.1016/j.cvsm.2016.11.011.
- Dirksen, K., Y.S. Roelen, M.E. van Wolferen, H.S. Kruitwagen, L.C. Penning, I.A. Burgener, B. Spee, and H. Fieten. 2016. Erythrocyte copper chaperone for superoxide dismutase and superoxide dismutase as biomarkers for hepatic copper concentrations in Labrador retrievers. *Vet. J.* 218:1–6. doi:10.1016/j.tvjl.2016.10.007.
- Drake, E.N. 2006. Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant. *Med. Hypotheses* 67:318–322.
- Duran, A., M. Tuzen, and M. Soylak. 2010. Trace element concentrations of some pet foods commercially available in Turkey. *Food Chem. Toxicol.* 48:2833–2837. doi:10.1016/j.fct.2010.07.014.
- Dzanis, D.A. 1994. The Association of American Feed Control Officials Dog and Cat Food Nutrient Profiles: substantiation of nutritional adequacy of complete and balanced pet foods in the United States. *J. Nutr.* 124:2535S–2539S.
- Dzanis, D.A. 2008. Understanding Regulations Affecting Pet Foods. *Top. Companion Anim. Med.* 23:117–120. doi:10.1053/J.TCAM.2008.04.002.
- Enginler, S.O., T.S.F. Toydemir, A. Ates, B. Ozturk, O. Erdogan, S. Ozdemir, I. Kirsan, M.E. Or, S.S. Arun, and U.B. Barutcu. 2015. Examination of oxidative/antioxidative status and trace element levels in dogs with mammary tumors. *Bulg. J. Agric. Sci.* 21:1086–1091.

- Esfahani, S.T., M.R. Hamidian, A. Madani, N. Ataei, P. Mohseni, M. Roudbari, and M. Haddadi. 2006. Serum zinc and copper levels in children with chronic renal failure. *Pediatr. Nephrol.* 21:1153–1156.
- Estévez, A.G., M.A. Sahawneh, P.S. Lange, N. Bae, M. Egea, and R.R. Ratan. 2006. Arginase 1 regulation of nitric oxide production is key to survival of trophic factor-deprived motor neurons. *J. Neurosci.* 26:8512–8516.
- Farrar, W.P., J.F. Edwards, and M.D. Willard. 1994. Pathology in a Dog Associated with Elevated Tissue Mercury Concentrations. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 6:511–514. doi:10.1177/104063879400600426.
- Fascetti, A. J., J.G. Morris, and Q.R. Rogers. 1998. Dietary copper influences reproductive efficiency of queens. *J. Nutr.* 128:2590S-2592S.
- Favier, R.P., B. Spee, L.C. Penning, and J. Rothuizen. 2011. Copper-induced hepatitis: the COMMD1 deficient dog as a translational animal model for human chronic hepatitis. *Vet. Q.* 31:49–60. doi:10.1080/01652176.2011.563146.
- Favier, R.P., B. Spee, B. a. Schotanus, T.S.G. a M. van den Ingh, H. Fieten, B. Brinkhof, C.S. Viebahn, L.C. Penning, and J. Rothuizen. 2012. COMMD1-Deficient dogs accumulate copper in hepatocytes and provide a good model for chronic hepatitis and fibrosis. *PLoS One* 7:1–8. doi:10.1371/journal.pone.0042158.
- FEDIAF. 2012. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs.
- Ferreira, M.D.F., A.E.A. Aylor, R.J. Mellanby, S.M. Campbell, and A.G. Gow. 2017. Investigation of manganese homeostasis in dogs with anaemia and chronic enteropathy. *Open Vet. J.* 7:360–366. doi:10.4314/ovj.v7i4.12.
- Fieten, H., V.C. Biourge, A.L. Watson, P.A.J. Leegwater, T.S.G.A.M. van den Ingh, and J. Rothuizen. 2015. Dietary Management of Labrador Retrievers with Subclinical Hepatic Copper Accumulation. *J. Vet. Intern. Med.* 29:822–827. doi:10.1111/jvim.12574.
- Fieten, H., K. Dirksen, T.S.G. a M. van den Ingh, E. a. Winter, A.L. Watson, P. a J. Leegwater, and J. Rothuizen. 2013a. D-penicillamine treatment of copper-associated hepatitis in Labrador retrievers. *Vet. J.* 196:522–527. doi:10.1016/j.tvjl.2012.12.013.
- Fieten, H., Y. Gill, A.J. Martin, M. Concilli, K. Dirksen, F.G. Van Steenbeek, B. Spee, T.S.G.A.M. Van Den Ingh, E.C.C.P. Martens, P. Festa, G. Chesì, B. Van De Sluis, R.H.J.H. Houwen, A.L. Watson, Y.S. Aulchenko, V.L. Hodgkinson, S. Zhu, M.J. Petris, R.S. Polishchuk, P.A.J. Leegwater, and J. Rothuizen. 2016. The Menkes and Wilson disease genes counteract in copper toxicosis in Labrador retrievers: A new canine model for copper-metabolism disorders. *DMM Dis. Model. Mech.* 9:25–38. doi:10.1242/dmm.020263.
- Fieten, H., B. d. Hooijer-Nouwens, V. c. Biourge, P. a. j. Leegwater, A. l. Watson, T. s. g. a. m. van den Ingh, and J. Rothuizen. 2012a. Association of Dietary Copper and Zinc Levels with Hepatic Copper and Zinc Concentration in Labrador Retrievers. *J. Vet. Intern. Med.* 26:1274–1280. doi:10.1111/j.1939-1676.2012.01001.x.
- Fieten, H., B.D. Hooijer-Nouwens, V.C. Biourge, P. A. J. Leegwater, A. L. Watson, T.S.G. a M. van den Ingh, and J. Rothuizen. 2012b. Association of Dietary Copper and Zinc Levels with Hepatic Copper and Zinc Concentration in Labrador Retrievers. *J. Vet. Intern. Med.* 26:1274–1280. doi:10.1111/j.1939-1676.2012.01001.x.
- Fieten, H., S. Hugen, T.S.G.A.M.S.G. a M. van den Ingh, W.H.H. Hendriks, J.C.M.C.M. Vernooij, P. Bode, A.L.L. Watson, P.A.J. a J. Leegwater, and J. Rothuizen. 2013b. Urinary excretion of

- copper, zinc and iron with and without D-penicillamine administration in relation to hepatic copper concentration in dogs. *Vet. J.* 197:468–473. doi:10.1016/j.tvjl.2013.03.003.
- Fieten, H., P.A.J. Leegwater, A.L. Watson, and J. Rothuizen. 2012c. Canine models of copper toxicosis for understanding mammalian copper metabolism. *Mamm. Genome* 23:62–75. doi:10.1007/s00335-011-9378-7.
- Fieten, H., L.C. Penning, P. a J. Leegwater, and J. Rothuizen. 2014. New canine models of copper toxicosis: Diagnosis, treatment, and genetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1314:42–48. doi:10.1111/nyas.12442.
- Fleming, J.M., K.E. Creevy, and D.E.L. Promislow. 2011. Mortality in North American Dogs from 1984 to 2004: An Investigation into Age-, Size-, and Breed-Related Causes of Death. *J. Vet. Intern. Med.* 25:187–198. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.0695.x.
- Flores, C.R., M.P. Puga, K. Wrobel, M.E.G. Sevilla, and K. Wrobel. 2011. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 91:333–341.
- Fly, A.D., and G.L. Czarnecki-Maulden. 2000. Iron bioavailability from hemoglobin and hemin in chick, rat, cat, and dog: a comparative study. *Nutr. Res.* 20:237–248.
- Forrer, R., K. Gautschi, and H. Lutz. 2001. Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS. *Biol. Trace Elem. Res.* 80:77–93. doi:10.1385/BTER:80:1:77.
- Foster, M., and S. Samman. 2012. Zinc and regulation of inflammatory cytokines: implications for cardiometabolic disease. *Nutrients* 4:676–694.
- Francesconi, K.A., and D. Kuehnelt. 2002. Arsenic compounds in the environment. In 'Environmental Chemistry of Arsenic'. (Eds WT Frankenberger Jr and M. Dekker.) pp. 51–94.
- Francesconi, K.A., R. Tanggaar, C.J. McKenzie, and W. Goessler. 2002. Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. *Clin. Chem.* 48:92–101.
- Fritz, H., D. Kennedy, D. Fergusson, R. Fernandes, K. Cooley, A. Seely, S. Sagar, R. Wong, and D. Seely. 2011. Selenium and lung cancer: a systematic review and meta analysis. *PLoS One* 6.
- Frost, D. V, C.A. Elvehjem, and E.B. Hart. 1939. The role of iron, copper, and cobalt in hemoglobin production in dogs on a milk diet. *J. Biol. Chem* 128:31.
- Fuentealba, C., S. Guest, S. Haywood, and B. Horney. 1997. Chronic hepatitis: A retrospective study in 34 dogs. *Can. Vet. J.* 38:365–373.
- Fuentealba, I.C., and E.M. Aburto. 2003. Animal models of copper-associated liver disease. *Comp. Hepatol.* doi:10.1186/1476-5926-2-5.
- Fyfe, J.C., U. Giger, P.F. Jezyk, D.F. Patterson, S.A. Klumpp, C.A. Hall, and J.S. Levine. 1991. Inherited selective intestinal cobalamin malabsorption and cobalamin deficiency in dogs. *Pediatr. Res.* 29:24–31. doi:10.1203/00006450-199101000-00006.
- Fyfe, J.C., S.L. Hemker, P.J. Venta, C.A. Fitzgerald, C.A. Outerbridge, S.L. Myers, and U. Giger. 2013. An exon 53 frameshift mutation in CUBN abrogates cubam function and causes Imerslund-Gräsbeck syndrome in dogs. *Mol. Genet. Metab.* 109:390–396. doi:10.1016/j.ymgme.2013.05.006.
- Gachot, B., M. Tauc, L. Morat, and P. Poujeol. 1991. Zinc uptake by proximal cells isolated from rabbit kidney: effects of cysteine and histidine. *Pflügers Arch.* 419:583–587.

- Gagné, J.W., J.J. Wakshlag, S.A. Center, M.A. Rutzke, and R.P. Glahn. 2013. Evaluation of calcium, phosphorus, and selected trace mineral status in commercially available dry foods formulated for dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 243:658–666. doi:10.2460/javma.243.5.658.
- Geoghegan, M., D. McAuley, S. Eaton, and J. Powell-Tuck. 2006. Selenium in critical illness. *Curr. Opin. Crit. Care* 12:136–141.
- Gow, A.G., A.I.C. Marques, D.A. Yool, A. Duncan, and R.J. Mellanby. 2010. Whole blood manganese concentrations in dogs with congenital portosystemic shunts. *J. Vet. Intern. Med.* 24:90–96.
- Goyer, R. a, and T.W. Clarkson. 2001. Toxic Effects of Metals. *Toxic Agents* 811–867.
- Grases, F., B.M. Simonet, R.M. Prieto, and J.G. March. 2001. Dietary phytate and mineral bioavailability. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 15:221–228. doi:10.1016/S0946-672X(01)80037-7.
- Greco, D.S. 2018. *Diabetes Mellitus in Animals*. Second Edi. Elsevier Inc.
- Green, P.D., and J.W. Lemckert. 1977. Vitamin E and selenium responsive myocardial degeneration in dogs. *Can. Vet. J.* 18:290.
- Gross, K.L., K.J. Wedekind, C.A. Kirk, W.D. Schoenherr, S.R. Lowry, and K.Q. Owen. 2000. Dietary chromium and carnitine supplementation does not affect glucose tolerance in obese dogs during weight loss. *J. Vet. Intern. Med.* 14:345.
- Guidelines, C.C. 2014. *Prevention, Diagnosis , and Management of Infection in Dogs Thank You to Our Generous Sponsors :. Hear. Soc.*
- Gumasta, P., A. Dubey, M. Swamy, Y.P. Sahni, and A. Anil. 2019. Immunohistochemical Expression of Oxidative Stress Markers in Bovine Tissues Correlated to Cadmium Concentration. *J. Anim. Res.* 9:721–726.
- Gumulec, J., M. Masarik, V. Adam, T. Eckschlager, I. Provaznik, and R. Kizek. 2014. Serum and tissue zinc in epithelial malignancies: a meta-analysis. *PLoS One* 9.
- Hansew, J E N S C; Reske-Nielsen, Edith; Thorlacius-ussing, Ole; Rungby, Jorgen; Danscher, G. 1989. DISTRIBUTION OF DIETARY MERCURY IN A DOG. QUANTITATION AND LOCALIZATION OF TOTAL MERCURY IN ORGANS AND CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Sci. Total Environ.* 78:23–43.
- Hansmann, F., I. Stephan, A. Wirtz, A.D. Gruber, and P. Wohlsein. 2009. Mercury poisoning in a german shepherd dog. *Vet. Rec.* 165:447–448. doi:10.1136/vr.165.15.447.
- Hardy, J. 2016. Zinc-responsive dermatosis.
- Harris, E.D. 2000. cellular copper transport and Metabolism. *Biophysics (Oxf)*. 291–310.
- Harro, C.C., R.C. Smedley, J.P. Buchweitz, and D.K. Langlois. 2019. Hepatic copper and other trace mineral concentrations in dogs with hepatocellular carcinoma. *J. Vet. Intern. Med.* 33:2193–2199. doi:10.1111/jvim.15619.
- Hays, S.M., K. Macey, D. Poddalgoda, M. Lu, A. Nong, and L.L. Aylward. 2016. Biomonitoring Equivalents for molybdenum. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 77:223–229.
- Haywood, S., M. Bournsnel, M.J. Loughran, J. Trafford, D. Isherwood, X. Liu, L. Olohan, and S.D. Carter. 2016. Copper toxicosis in non-COMMD1 Bedlington terriers is associated with metal transport gene ABCA12. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 35:83–89. doi:10.1016/j.jtemb.2016.01.015.
- Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, B. Galy, and C. Camaschella. 2010. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142:24–38.

- Herd, T.H., and B. Hoff. 2011. The Use of Blood Analysis to Evaluate Trace Mineral Status in Ruminant Livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27:255–283. doi:10.1016/J.CVFA.2011.02.004.
- Hill, T.L., E.B. Breitschwerdt, T. Cecere, and S. Vaden. 2008. Concurrent hepatic copper toxicosis and Fanconi's syndrome in a dog. *J. Vet. Intern. Med.* 22:219–222. doi:10.1111/j.1939-1676.2007.0040.x.
- Hirano, T., M. Murakami, T. Fukada, K. Nishida, S. Yamasaki, and T. Suzuki. 2008. Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. *Adv. Immunol.* 97:149–176.
- Hoffmann, G. 2009. Copper-Associated Liver Diseases. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 39:489–511. doi:10.1016/j.cvsm.2009.02.001.
- Hoffmann, G., P.G. Jones, V. Biourge, T.S.G.A.M. van den Ingh, S.J. Mesu, P. Bode, and J. Rothuizen. 2009a. Dietary Management of Hepatic Copper Accumulation in Labrador Retrievers. *J. Vet. Intern. Med.* 23:957–963. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0352.x.
- Hoffmann, G., P.G. Jones, V. Biourge, S.J. Mesu, P. Bode, and J. Rothuizen. 2009b. Dietary Management of Hepatic Copper Accumulation in Labrador Retrievers 957–963.
- Honeckman, A. 2003. Current concepts in the treatment of canine chronic hepatitis. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 18:239–44. doi:10.1016/S1096-2867(03)00050-1.
- Hughes, M.F. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133:1–16.
- Hunt, K.M., R.K. Srivastava, C.A. Elmet, and M. Athar. 2014. The mechanistic basis of arsenicosis: pathogenesis of skin cancer. *Cancer Lett.* 354:211–219.
- IARC, W.G. on the E. of C.R. 2012. Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. risks to humans* 100:11.
- van den Ingh, T.S., and J. Rothuizen. 1992. Accumulation of copper and iron in the liver of a boxer: a new disease?. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 117:16S.
- van den Ingh, T.S.G. a M., P.M. Punte, E.N.L.J. Hoogendijk, and J. Rothuizen. 2007. Possible nutritionally induced copper-associated chronic hepatitis in two dogs. *Vet. Rec.* 161:728. doi:10.1136/vr.161.21.728.
- Iskra, R. 2010. Some indexes of protein and lipid metabolism in blood of piglets at increased level of chromium in ration. *Anim Biol* 12:221–224.
- Iskra, R., and H. Antonyak. 2018. *Chromium in Health and Longevity*. Springer.
- Johnston, A.N., S.A. Center, S.P. McDonough, J.J. Wakshlag, and K.L. Warner. 2013. Hepatic copper concentrations in labrador retrievers with and without chronic hepatitis: 72 cases (1980–2010). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 242:372–380. doi:10.2460/javma.242.3.372.
- Kastenmayer, P., G.L. Czarnecki-Maulden, and W. King. 2002. Mineral and trace element absorption from dry dog food by dogs, determined using stable isotopes. *J. Nutr.* 132:1670S–2S.
- Kather, S., N. Grützner, P.H. Kook, F. Dengler, and R.M. Heilmann. 2020. Review of cobalamin status and disorders of cobalamin metabolism in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 34:13–28. doi:10.1111/jvim.15638.
- Kazmierski, K.J., G.K. Ogilvie, M.J. Fettman, S.E. Lana, J.A. Walton, R.A. Hansen, K.L. Richardson, D.W. Hamar, C.L. Bedwell, G. Andrews, and S. Chavey. 2001. Serum zinc, chromium, and iron

- concentrations in dogs with lymphoma and osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 15:585–588. doi:10.1111/j.1939-1676.2001.tb01595.x.
- Keen, C.L., and S. Zidenberg-Cherr. 1994. Manganese toxicity in humans and experimental animals. *Manganese Heal. Dis.* 193–205.
- Kelly, D.G., S.D. White, and R.D. Weir. 2013. Elemental composition of dog foods using nitric acid and simulated gastric digestions. *Food Chem. Toxicol.* 55:568–577. doi:10.1016/j.fct.2013.01.057.
- Khanna, C., H.J. Boermans, P. Woods, and R. Ewing. 1992. Lead toxicosis and changes in the blood lead concentration of dogs exposed to dust containing high levels of lead. *Can. Vet. J. = La Rev. Vet. Can.* 33:815–817.
- Kilpatrick, S., A. Jacinto, R.D. Foale, S.W. Tappin, C. Burton, P.E. Frowde, C.M. Elwood, R. Powell, A. Duncan, and R.J. Mellanby. 2014. Whole blood manganese concentrations in dogs with primary hepatitis. *J. Small Anim. Pract.* 55:241–246.
- Kim, H., J. Loftus, J.W. Gagne, M.A. Rutzke, R.P. Glahn, and J.J. Wakshlag. 2018a. Evaluation of selected ultra-trace minerals in commercially available dry dog foods. *Vet. Med. Res. Reports* Volume 9:43–51. doi:10.2147/vmrr.s165890.
- Kim, H.T., J.P. Loftus, S. Mann, and J.J. Wakshlag. 2018b. Evaluation of arsenic, cadmium, lead and mercury contamination in over-the-counter available dry dog foods with different animal ingredients (Red Meat, Poultry, and Fish). *Front. Vet. Sci.* 5:1–8. doi:10.3389/fvets.2018.00264.
- Kim, M.J., H.J. Oh, J.E. Park, G.A. Kim, E.J. Park, G. Jang, and B.C. Lee. 2012. Effects of mineral supplements on ovulation and maturation of dog oocytes. *Theriogenology* 78:110–115. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.01.026.
- Klaassen, C.D. 1974. Biliary excretion of arsenic in rats, rabbits, and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 29:447–457.
- Klaassen, C.D., J. Liu, and B.A. Diwan. 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 238:215–220.
- Klaassen, C.D., and D.W. Shoeman. 1974. Biliary excretion of lead in rats rabbits, and dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 29:434–446.
- Klein, D., J. Lichtmannegger, U. Heinzmann, J. Müller-Höcker, S. Michaelsen, and K.H. Summer. 1998. Association of copper to metallothionein in hepatic lysosomes of Long-Evans cinnamon (LEC) rats during the development of hepatitis. *Eur. J. Clin. Invest.* 28:302–310. doi:10.1046/j.1365-2362.1998.00292.x.
- Knight, T.E., and M.S.A. Kumar. 2003. Lead toxicosis in cats—a review. *J. Feline Med. Surg.* 5:249–255.
- Kobayashi, Y., Y. Ogra, K. Ishiwata, H. Takayama, N. Aimi, and K.T. Suzuki. 2002. Selenosugars are key and urinary metabolites for selenium excretion within the required to low-toxic range. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:15932–15936.
- Kodama, H., C. Fujisawa, and W. Bhadhprasit. 2012. Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *Curr. Drug Metab.* 13:237–250. doi:10.2174/138920012799320455.

- Komatsu, Y., I. Sadakata, Y. Ogra, and K.T. Suzuki. 2000. Excretion of copper complexed with thiomolybdate into the bile and blood in LEC rats. *Chem. Biol. Interact.* 124:217–231. doi:10.1016/S0009-2797(99)00159-3.
- Kośła, T., M. Skibniewski, E.M. Skibniewska, I. Lasocka, and M. Koźnierzak. 2019. *Molybdenum*, Mo. Springer.
- Lan, C., G. Rodarte, L.A. Murillo, T. Jones, R.W. Davis, J. Dungan, G. Newport, and N. Agabian. 2004. Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 53:1451–1469.
- Langlois, D.K. 2015. Tetrathiomolybdate After Intravenous and Oral Administration To Healthy Dogs 76.
- Langlois, D.K., R.C. Smedley, W.D. Schall, and J.M. Kruger. 2013. Acquired proximal renal tubular dysfunction in 9 labrador retrievers with copper-associated hepatitis (2006-2012). *J. Vet. Intern. Med.* 27:491–499. doi:10.1111/jvim.12065.
- Lauten, S.D., N.R. Cox, W.R. Brawner Jr, S.A. Goodman, J.T. Hathcock, R.D. Montgomery, S.A. Kincaid, N.E. Morrison, J.S. Spano, and A.J. Lepine. 2002. Influence of dietary calcium and phosphorus content in a fixed ratio on growth and development in Great Danes. *Am. J. Vet. Res.* 63:1036–1047.
- Leroy, B.E., and N. Northrup. 2009. Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. *Vet. J.* 180:149–62. doi:10.1016/j.tvjl.2008.07.012.
- Lewis, R.C., L.E. Johns, and J.D. Meeker. 2016. Exploratory analysis of the potential relationship between urinary molybdenum and bone mineral density among adult men and women from NHANES 2007–2010. *Chemosphere* 164:677–682.
- Linder, M., and M. Hazegh-Azam. 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 63:797S – 811.
- Lisboa, P.E. 1971. Experimental hepatic cirrhosis in dogs caused by chronic massive iron overload. *Gut* 12:363–368.
- Liu, Y., H. Xu, W. Zhong, Q. Shen, T. Zhuang, and K. Huang. 2015. Organic selenium alleviated the formation of ethylene glycol-induced calcium oxalate renal calculi by improving osteopontin expression and antioxidant capability in dogs. *Biol. Trace Elem. Res.* 168:392–400.
- de Lorgeril, M., P. Salen, M. Accominotti, M. Cadau, J. Steghens, F. Boucher, and J. de Leiris. 2001. Dietary and blood antioxidants in patients with chronic heart failure. Insights into the potential importance of selenium in heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* 3:661–669.
- Luippold, A., and M.S. Gustin. 2016. Mercury concentrations in wet and dry cat and dog food. *Anim. Feed Sci. Technol.* 222:190–193. doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.10.021.
- Luna, D., M. López-Alonso, Y. Cedeño, L. Rigueira, V. Pereira, and M. Miranda. 2019. Determination of Essential and Toxic Elements in Cattle Blood: Serum vs Plasma. *Animals* 9:465. doi:10.3390/ani9070465.
- Lutsenko, S., N.L. Barnes, M.Y. Bartee, and O.Y. Dmitriev. 2007. Function and regulation of human copper-transporting ATPases.. *Physiol. Rev.* 87:1011–1046. doi:10.1152/physrev.00004.2006.
- Macotpet, A., F. Suksawat, P. Sukon, K. Pimpakdee, E. Pattarapanwichien, R. Tangrassameeprasert, and P. Boonsiri. 2013. Oxidative stress in cancer-bearing dogs assessed by measuring serum malondialdehyde. *BMC Vet. Res.* 9:101.

- Mafra, D., L. Cuppari, and S.M.F. Cozzolino. 2002. Iron and zinc status of patients with chronic renal failure who are not on dialysis. *J. Ren. Nutr.* 12:38–41.
- Mandigers, P.J.J., T.S.G. a M. van den Ingh, P. Bode, E. Teske, and J. Rothuizen. 2004. Association between liver copper concentration and subclinical hepatitis in Doberman Pinschers. *J. Vet. Intern. Med.* 18:647–650. doi:10.1111/j.1939-1676.2004.tb02600.x.
- Marques, O., A. Canadas, F. Faria, E. Oliveira, I. Amorim, F. Seixas, A. Gama, A. Lobo-da-Cunha, B.M. da Silva, G. Porto, and C. Lopes. 2017. Expression of iron-related proteins in feline and canine mammary gland reveals unexpected accumulation of iron. *Biotech. Histochem.* 92:584–594. doi:10.1080/10520295.2017.1369160.
- Matsuno, K., Y. Kodama, and K. Tsuchiya. 1991. Biological half-time and body burden of cadmium in dogs after a long-term oral administration of cadmium. *Biol. Trace Elem. Res.* 29:111–123.
- Mayer, L.S., P. Uciechowski, S. Meyer, T. Schwerdtle, L. Rink, and H. Haase. 2014. Differential impact of zinc deficiency on phagocytosis, oxidative burst, and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Metallomics* 6:1288–1295.
- McCown, J.L., and A.J. Specht. 2011. Iron homeostasis and disorders in dogs and cats: A review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 47:151–160. doi:10.5326/JAAHA-MS-5553.
- Mert, H., N. Mert, I. Dogan, M. Cellat, and S. Yasar. 2008. Element status in different breeds of dogs. *Biol. Trace Elem. Res.* 125:154–159. doi:10.1007/s12011-008-8160-5.
- Meuten, D.J. 2016. *Tumors in Domestic Animals*. John Wiley & Sons.
- Meyer, H. 1984. Mineral metabolism and requirements in bitches and suckling pups. Pages 13–24 in *Nutrition and behaviour in dogs and cats*, Oslo.
- Montaser, A., C. Tetreault, and M. Linder. 1992. Comparison of Copper Binding Components in Dog Serum with Those in Other Species. *Exp. Biol. Med.* 200:321–329. doi:10.3181/00379727-200-43437.
- Morgan, R. V. 1994. Lead poisoning in small companion animals: an update (1987-1992). *Vet. Hum. Toxicol.* 36:18–22.
- Moulis, J.-M. 2010. Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals. *Biomaterials* 23:877–896.
- Muzik, P., J. Mainz, O. Huml, C.D. Sindberg, and S. Moesgaard. 2011. Diabetes mellitus in dogs and cats—clinical experience with bioactive chromium supplementation in dogs treated with insulin. *EJCAP* 21:62–67.
- Nangliya, V., A. Sharma, D. Yadav, S. Sunder, S. Nijhawan, and S. Mishra. 2015. Study of Trace Elements in Liver Cirrhosis Patients and Their Role in Prognosis of Disease. *Biol. Trace Elem. Res.* 165:35–40. doi:10.1007/s12011-015-0237-3.
- Nederbragt, H., and A.J. Lagerwerf. 1986. Strain-related patterns of biliary excretion and hepatic distribution of copper in the rat. *Hepatology* 6:601–607. doi:10.1002/hep.1840060409.
- Neiger, R.D., and G.D. Osweiler. 1992. Arsenic concentrations in tissues and body fluids of dogs on chronic low-level dietary sodium arsenite.. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4:334–337. doi:10.1177/104063879200400318.
- Neumann, S. 2003. Serum iron level as an indicator for inflammation in dogs and cats. *Comp. Clin. Path.* 12:90–94. doi:10.1007/s00580-003-0481-3.

- Nomiyama, K., and H. Nomiyama. 1984. Reversibility of cadmium-induced health effects in rabbits. *Environ. Health Perspect.* 54:201–211.
- Novoselov, S. V, G. V Kryukov, X.-M. Xu, B.A. Carlson, D.L. Hatfield, and V.N. Gladyshev. 2007. Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *J. Biol. Chem.* 282:11960–11968.
- NRC. 2005. Mineral Tolerance of Animals. National Academies Press, Washington, D.C.
- NRC. 2006. Nutrient Requirements of Dogs and Cats. National Academies Press, Washington, D.C.
- Nyasae, L.K., M.J. Schell, and A.L. Hubbard. 2014. Copper Directs ATP7B to the Apical Domain of Hepatic Cells via Basolateral Endosomes. *Traffic* 15:1344–1365. doi:10.1111/tra.12229.
- Nzengue, Y., S.M. Candéias, S. Sauvaigo, T. Douki, A. Favier, W. Rachidi, and P. Guiraud. 2011. The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: its redox biomarkers. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25:171–80. doi:10.1016/j.jtemb.2011.06.002.
- Olmedo, P., A. Pla, A.F. Hernández, F. Barbier, L. Ayouni, and F. Gil. 2013. Determination of toxic elements (mercury, cadmium, lead, tin and arsenic) in fish and shellfish samples. Risk assessment for the consumers. *Environ. Int.* 59:63–72.
- Opreanu, R.-A., and M. Codreanu. 2018. RISK FACTORS IN FELINE HYPERTHYROIDISM. *Sci. Work. Ser. C. Vet. Med.* LXIV:2067–3663.
- Özpinar, H., I. Abas, T. Bilal, and G. Demirel. 2001. Investigation of excretion and absorption of different zinc salts in puppies. *Lab. Anim.* 35:282–287. doi:10.1258/0023677011911615.
- Panel, E., and F. Chain. 2010. Scientific Opinion on Lead in Food. *EFSA J.* 8:1–151. doi:10.2903/j.efsa.2010.1570.
- Park, S., C.W. Jung, K. Kim, S.J. Kim, W.S. Kim, and J.H. Jang. 2015. Iron deficient erythropoiesis might play key role in development of anemia in cancer patients. *Oncotarget* 6:42803.
- Park, S.H., M.H. Lee, and S.K. Kim. 2005. Studies on the concentrations of Cd, Pb, Hg and Cr in dog serum in Korea. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 18:1623–1627. doi:10.5713/ajas.2005.1623.
- Pasha, Q., S.A. Malik, N. Shaheen, and M.H. Shah. 2010. Comparison of trace elements in the scalp hair of malignant and benign breast lesions versus healthy women. *Biol. Trace Elem. Res.* 134:160–173.
- Pedrinelli, V., R.V.A. Zafalon, R.B.A. Rodrigues, M.P. Perini, R.M.C. Conti, T.H.A. Vendramini, J.C. de Carvalho Balieiro, and M.A. Brunetto. 2019. Concentrations of macronutrients, minerals and heavy metals in home-prepared diets for adult dogs and cats. *Sci. Rep.* 9:1–12. doi:10.1038/s41598-019-49087-z.
- Pereira, A.M., E. Pinto, E. Matos, F. Castanheira, A.A. Almeida, C.S. Baptista, M.A. Segundo, A.J.M. Fonseca, and A.R.J. Cabrita. 2018. Mineral Composition of Dry Dog Foods: Impact on Nutrition and Potential Toxicity. *J. Agric. Food Chem.* 66:7822–7830. doi:10.1021/acs.jafc.8b02552.
- Pilarczyk, B., A. Tomza-Marciniak, R. Pilarczyk, M. Bakowska, M. Gaik, M. Wilk, and J. Kuba. 2013. Relationship between serum Se concentration in dogs and incidence of some disease conditions. *Cent. Eur. J. Biol.* 8:527–533. doi:10.2478/s11535-013-0163-8.
- Poldervaart, J.H., R.P. Favier, L.C. Penning, T.S.G. a M. Van Den Ingh, and J. Rothuizen. 2009. Primary hepatitis in dogs: A retrospective review (2002-2006). *J. Vet. Intern. Med.* 23:72–80. doi:10.1111/j.1939-1676.2008.0215.x.

- Prasad, D.K.V., U. Shaheen, U. Satyanarayana, T. Surya Prabha, A. Jyothy, and A. Munshi. 2014. Association of Serum Trace Elements and Minerals with Genetic Generalized Epilepsy and Idiopathic Intractable Epilepsy. *Neurochem. Res.* 39:2370–2376. doi:10.1007/s11064-014-1439-3.
- Prescott, C.W. 1983. Clinical findings in dogs and cats with lead poisoning. *Aust. Vet. J.* 60:270–271.
- Puls R. 1994. Mineral Levels in Animal Health. second. Clearbrook: Sherpa International, Canada.
- Rahman, M.A., H. Hasegawa, M.M. Rahman, M.A. Rahman, and M.A.M. Miah. 2007. Accumulation of arsenic in tissues of rice plant (*Oryza sativa* L.) and its distribution in fractions of rice grain. *Chemosphere* 69:942–948.
- Ratnaike, R.N. 2003. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad. Med. J.* 79:391–396.
- Rayman, M.P. 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc. Nutr. Soc.* 64:527–542. doi:10.1079/PNS2005467.
- dos Reis, A.R., H. El-Ramady, E.F. Santos, P.L. Gratão, and L. Schomburg. 2017. Overview of selenium deficiency and toxicity worldwide: affected areas, selenium-related health issues, and case studies. Springer.
- Rifkin, J., and M.D. Miller. 2014. Copper-associated hepatitis in a Pembroke Welsh corgi. *Can. Vet. J.* 55:573–576.
- de Romaña, D.L., M. Olivares, R. Uauy, and M. Araya. 2011. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25:3–13. doi:10.1016/j.jtemb.2010.11.004.
- Rose, M., J. Lewis, N. Langford, M. Baxter, S. Origgi, M. Barber, H. MacBain, and K. Thomas. 2007. Arsenic in seaweed—forms, concentration and dietary exposure. *Food Chem. Toxicol.* 45:1263–1267.
- Roussel, A.M. 2000. New aspects on trace element metabolism disturbances in man and pet animals. *Rev. Med. Vet. (Toulouse)*. 151:637–642.
- Russo, C., and A.P.F.R.L. Bracarense. 2016. Oxidative stress in dogs. *Semin. Agrar.* 37:1431–1440. doi:10.5433/1679-0359.2016v37n3p1431.
- Saito, H. 2014. Metabolism of iron stores. *Nagoya J. Med. Sci.* 76:235–254. doi:10.1001/jama.1940.02810300045013.
- Saleh, S.A.K., H.M. Adly, A.A. Abdelkhalik, and A.M. Nassir. 2020. Serum Levels of Selenium, Zinc, Copper, Manganese, and Iron in Prostate Cancer Patients. *Curr. Urol.* 14:44–49.
- Sanagoo, A., F. Kiani, M.S. Gharenaz, F. Sayehmiri, F. Koohi, L. Jouybari, and M. Dousti. 2020. A systematic review and meta-analysis on the association of serum and tumor tissue iron and risk of breast cancer. *Casp. J. Intern. Med.* 11:1–11. doi:10.22088/cjim.11.1.1.
- Sandhu, J.S., A.P.S. Narang, K.L. Bhatia, J. Adlakha, and D. Khullar. 2005. Trace elements and oxidative stress in chronic renal failure. *Trace Elem. Electrolytes* 22:233–235. doi:10.5414/tep22233.
- Schachter, S., R.W. Nelson, and C.A. Kirk. 2001. Oral chromium picolinate and control of glycemia in insulin-treated diabetic dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 15:379–384. doi:10.1111/j.1939-1676.2001.tb02333.x.
- Schilsky, M.L., A. N. Irani, G.R. Gorla, I. Volenberg, and S. Gupta. 2000. Biliary copper excretion capacity in intact animals: correlation between ATP7B function, hepatic mass, and biliary

- copper excretion. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14:210–214. doi:10.1002/(SICI)1099-0461(2000)14:4<210::AID-JBT5>3.0.CO;2-G [pii].
- Schultheiss, P.C., C.L. Bedwell, D.W. Hamar, and M.J. Fettman. 2002. Canine liver iron, copper, and zinc concentrations and association with histologic lesions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14:396–402. doi:10.1177/104063870201400506.
- Seyrek, K., T. Karagenç, S. Paşa, F. Kiral, and A. Atasoy. 2009. Serum Zinc, Iron and Copper Concentrations in Dogs Infected with *Hepatozoon canis*. *Acta Vet. Brno* 78:471–475. doi:10.2754/avb200978030471.
- Sharadamma, K.C., B. Purushotham, P.M. Radhakrishna, P.M. Abhilekha, and H.M. Vagdevi. 2011. Role of selenium in pets health and nutrition: A review. *Asian J. Anim. Sci.* 5:64–70. doi:10.3923/ajas.2011.64.70.
- Smedley, R., T. Mullaney, and W. Rumble. 2009. Copper-associated hepatitis in Labrador Retrievers. *Vet. Pathol.* 46:484–490. doi:10.1354/vp.08-VP-0197-S-FL.
- Smith, D., R. Gwiazda, R. Bowler, H. Roels, R. Park, C. Taicher, and R. Lucchini. 2007. Biomarkers of Mn exposure in humans. *Am. J. Ind. Med.* 50:801–811.
- Soetan, K.O., C.O. Olaiya, and O.E. Oyewole. 2010. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants : A review. *African J. Food Sci.* 4:200–222.
- Soltanian, A., J. Khoshnegah, and M. Heidarpour. 2016. Comparison of serum trace elements and antioxidant levels in terrier dogs with or without behavior problems. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 180:87–92. doi:10.1016/J.APPLANIM.2016.04.012.
- Spee, B., B. Arends, T.S.G.A.M. Van Den Ingh, L.C. Penning, and J. Rothuizen. 2006. Copper metabolism and oxidative stress in chronic inflammatory and cholestatic liver diseases in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 20:1085–1092. doi:10.1892/0891-6640(2006)20[1085:CMAOSI]2.0.CO;2.
- Sprague, W.S., T.B. Hackett, J.S. Johnson, and C.J. Swardson-Oliver. 2003. Hemochromatosis secondary to repeated blood transfusions in a dog. *Vet. Pathol.* 40:334–337. doi:10.1354/vp.40-3-334.
- Squitti, R., F. Bressi, P. Pasqualetti, C. Bonomini, R. Ghidoni, G. Binetti, E. Cassetta, F. Moffa, M. Ventriglia, and F. Vernieri. 2009. Longitudinal prognostic value of serum “free” copper in patients with Alzheimer disease. *Neurology* 72:50–55.
- Strickland, J.M., J.P. Buchweitz, R.C. Smedley, K.J. Olstad, R.S. Schultz, N.B. Oliver, and D.K. Langlois. 2018. Hepatic copper concentrations in 546 dogs (1982–2015). *J. Vet. Intern. Med.* 32:1943–1950. doi:10.1111/jvim.15308.
- Striffler, J.S., J.S. Law, M. Polansky, S.J. Bhatena, and R.A. Anderson. 1995. Chromium Improves Insulin Response to Glucose in Rats 44:1314–1320.
- Su, L.-C., C.A. J. Owen, P.E. Zollman, and R.M. Hardy. 1982. A defect of biliary excretion of copper in copper-laden Bedlington terriers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 243:G231–236.
- Sullivan, T.W., J.H. Douglas, and N.J. Gonzalez. 1994. Levels of various elements of concern in feed phosphates of domestic and foreign origin. *Poult. Sci.* 73:520–528.
- Surai, P.F. 2006. *Selenium in Nutrition and Health*. Nottingham university press Nottingham.
- Suttle, N.F. 2010. *Mineral Nutrition of Livestock: Fourth Edition*. Four ed. CABI, Wallingford, UK.

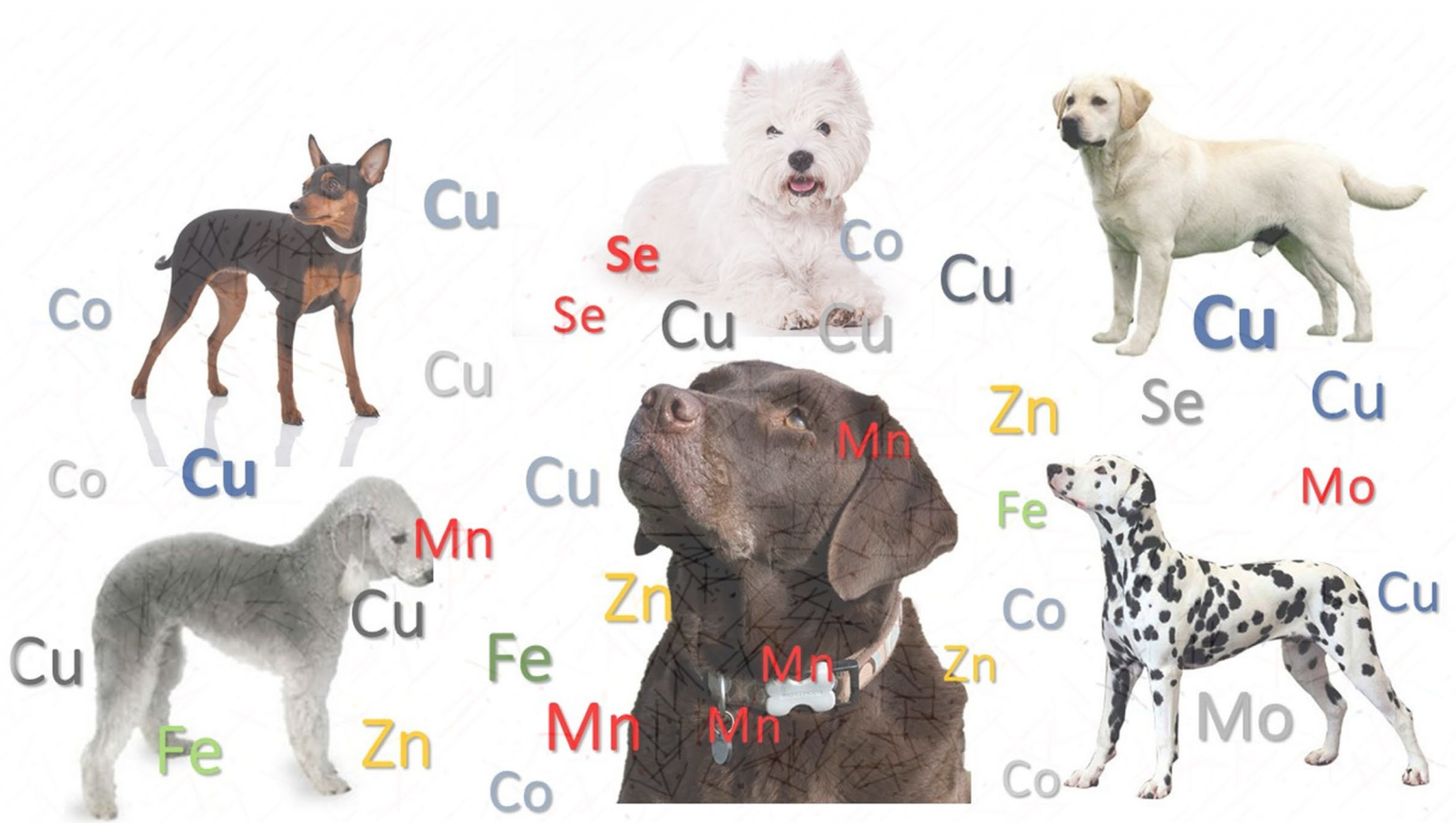
- Tapiero, H., D.M. Townsend, and K.D. Tew. 2003. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed. Pharmacother.* 57:386–398. doi:10.1016/S0753-3322(03)00012-X.
- Taylor, K.M., P. Vichova, N. Jordan, S. Hiscox, R. Hendley, and R.I. Nicholson. 2008. ZIP7-mediated intracellular zinc transport contributes to aberrant growth factor signaling in antihormone-resistant breast cancer Cells. *Endocrinology* 149:4912–4920.
- Thompson, L.J., J.O. Hall, and G.L. Meerdink. 1991. Toxic effects of trace element excess. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 7:277–306.
- Thornburg, L.P. 2000. A perspective on copper and liver disease in the dog. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:101–110. doi:10.1177/104063870001200201.
- Thornburg, L.P., M. Beissenherz, M. Dolan, and M.F. Raisbeck. 1985. Histochemical demonstration of copper and copper-associated protein in the canine liver. *Vet. Pathol.* 22:327–332. doi:10.1177/030098588502200405.
- Thornburg, L.P., and G. Rottinghaus. 1985. What is the significance of hepatic copper values in dogs with cirrhosis?. *Vet. Med.*
- Thornburg, L.P., G. Rottinghaus, M. McGowan, K. Kupka, S. Crawford, and S. Forbes. 1990. Hepatic copper concentrations in purebred and mixed-breed dogs. *Vet. Pathol.* 27:81–88. doi:10.1177/030098589002700202.
- Thornburg, L.P., D. Shaw, M. Dolan, M. Raisbeck, S. Crawford, G.L. Dennis, and D.B. Olwin. 1986. Hereditary copper toxicosis in West Highland white terriers. *Vet. Pathol.* 23:148–154. doi:10.1177/030098588602300207.
- Tirapegui, J. 2008. The nutritional biochemistry of chromium (III). *Rev. Bras. Ciências Farm.* 44:532–532. doi:10.1590/s1516-93322008000300028.
- Todd, W.R., C.A. Elvehjem, and E.B. Hart. 1933. Zinc in the nutrition of the rat. *Am. J. Physiol. Content* 107:146–156.
- Tomza-Marciniak, A., B. Pilarczyk, M. Bąkowska, M. Ligocki, and M. Gaik. 2012. Lead, cadmium and other metals in serum of pet dogs from an urban area of NW Poland. *Biol. Trace Elem. Res.* 149:345–351. doi:10.1007/s12011-012-9433-6.
- Toresson, L., J.M. Steiner, E. Spodsberg, G. Olmedal, J.S. Suchodolski, J.A. Lidbury, and T. Spillmann. 2019. Effects of oral versus parenteral cobalamin supplementation on methylmalonic acid and homocysteine concentrations in dogs with chronic enteropathies and low cobalamin concentrations. *Vet. J.* 243:8–14.
- Toyokuni, S. 2008. Molecular mechanisms of oxidative stress-induced carcinogenesis: From epidemiology to oxygenomics. *IUBMB Life* 60:441–447.
- Trevizan, L., M.M. Fischer, C.R. Rodenbusch, R.V. Labres, and A. de M. Kessler. 2013. Effects of Diets Containing Organic and Inorganic Zinc Sources on Hair Characteristics, Zinc Concentration in Blood and Hair, and the Immune Response of Dogs. *Acta Sci. Vet.* 41.
- Turnlund, J.R., and W.R. Keyes. 2004. Plasma molybdenum reflects dietary molybdenum intake. *J. Nutr. Biochem.* 15:90–95.
- Twedt, D. C., Sternlieb, I., & Gilbertson, S.R. 1979. Clinical, morphologic, and chemical studies on copper toxicosis of Bedlington Terriers. *Am. Vet. Med. Assoc.* 175:269–275.

- Van, J.F.V. 1975. Experimentally induced vitamin E-selenium deficiency in the growing dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 166:769–774.
- Vanholder, R., R. Cornelis, A. Dhondt, and N. Lameire. 2002. The role of trace elements in uraemic toxicity. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17:2–8. doi:10.1093/ndt/17.suppl_2.2.
- Vesey, D.A. 2010. Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: Focus on the interaction with essential metals. *Toxicol. Lett.* 198:13–19. doi:10.1016/j.toxlet.2010.05.004.
- Vincent, J.B. 2018. The Biochemistry of Chromium. *J. Nutr.* 130:715–718. doi:10.1093/jn/130.4.715.
- Vitale, S., D.W. Hague, K. Foss, M.C. de Godoy, and L.E. Selmic. 2019. Comparison of Serum Trace Nutrient Concentrations in Epileptics Compared to Healthy Dogs. *Front. Vet. Sci.* 6:1–8. doi:10.3389/fvets.2019.00467.
- Vonk, W.I.M., C. Wijmenga, R. Berger, B. van de Sluis, and L.W.J. Klomp. 2010. Cu,Zn superoxide dismutase maturation and activity are regulated by COMMD1. *J. Biol. Chem.* 285:28991–9000. doi:10.1074/jbc.M110.101477.
- Vonk, W.I.M., C. Wijmenga, and B. Van De Sluis. 2008. Relevance of animal models for understanding mammalian copper homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 88:840–845.
- Waters, D.J., and E.C. Chiang. 2018. Five threads: How U-shaped thinking weaves together dogs, men, selenium, and prostate cancer risk. *Free Radic. Biol. Med.* 127:36–45. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.039.
- Watson, P.J., a. J. a Roulois, T. Scase, P.E.J. Johnston, H. Thompson, and M.E. Herrtage. 2007. Prevalence and breed distribution of chronic pancreatitis at post-mortem examination in first-opinion dogs. *J. Small Anim. Pract.* 48:609–618. doi:10.1111/j.1748-5827.2007.00448.x.
- Webb, C.B., D.C. Twedt, and D.J. Meyer. 2002. Copper-associated liver disease in Dalmatians: a review of 10 dogs (1998-2001). *J. Vet. Intern. Med.* 16:665–668. doi:10.1892/0891-6640(2002)016<0665:CLDIDA>2.3.CO;2.
- Webster, C.R.L., S.A. Center, J.M. Cullen, D.G. Penninck, K.P. Richter, D.C. Twedt, and P.J. Watson. 2019. ACVIM consensus statement on the diagnosis and treatment of chronic hepatitis in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 33:1173–1200. doi:10.1111/jvim.15467.
- Weiss, G., and L.T. Goodnough. 2005. Anemia of chronic disease. *N. Engl. J. Med.* 352:1011–1023.
- Whanger, P.D., N.D. Pedersen, J. Hatfield, and P.H. Weswig. 1976. Absorption of selenite and selenomethionine from ligated digestive tract segments in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 153:295–297.
- Wheby, M.S., and D.A. Spyker. 1981. Hemoglobin iron absorption kinetics in the iron-deficient dog. *Am. J. Clin. Nutr.* doi:10.1093/ajcn/34.9.1686.
- White, S.D., P. Bourdeau, R.A.W. Rosychuk, B. Cohen, T. Bonenberger, K. V Fieseler, P. Ihrke, P.L. Chapman, P. Schultheiss, and G. Zur. 2001. Zinc-responsive dermatosis in dogs: 41 cases and literature review. *Vet. Dermatol.* 12:101–109.
- Whitney, K.M., S.A. Goodman, E.M. Bailey, and C.D. Lothrop Jr. 1994. The molecular basis of canine pyruvate kinase deficiency. *Exp. Hematol.* 22:866.
- Whittemore, J.C., K.M. Newkirk, D.M. Reel, and a. Reed. 2012. Hepatic copper and iron accumulation and histologic findings in 104 feline liver biopsies. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 24:656–661. doi:10.1177/1040638712445765.

- Withrow, S.J., R. Page, and D.M. Vail. 2020. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Elsevier Health Sciences.
- Wrighting, D.M., and N.C. Andrews. 2006. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 108:3204–3209.
- Wu, T., C.T. Sempos, J.L. Freudenheim, P. Muti, and E. Smit. 2004. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Ann. Epidemiol.* 14:195–201. doi:10.1016/S1047-2797(03)00119-4.
- Yang, T.-Y., C.-C. Yen, K.-I. Lee, C.-C. Su, C.-Y. Yang, C.-C. Wu, S.-S. Hsieh, K.-C. Ueng, and C.-F. Huang. 2016. Molybdenum induces pancreatic β -cell dysfunction and apoptosis via interdependent of JNK and AMPK activation-regulated mitochondria-dependent and ER stress-triggered pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 294:54–64.
- Zaccaroni, A., A. Corteggio, G. Altamura, M. Silvi, R. Di Vaia, C. Formigaro, and G. Borzacchiello. 2014. Elements levels in dogs from “triangle of death” and different areas of Campania region (Italy). *Chemosphere* 108:62–69. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.03.041.
- Zager, R.A., A.C.M. Johnson, and S.Y. Hanson. 2004. Parenteral iron therapy exacerbates experimental sepsis Rapid Communication. *Kidney Int.* 65:2108–2112.
- van Zelst, M., M. Hesta, K. Gray, K. Goethals, and G.P.J. Janssens. 2017. Predictive equations of selenium accessibility of dry pet foods. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 101:429–433. doi:10.1111/jpn.12593.
- van Zelst, M., M. Hesta, K. Gray, R. Staunton, G. Du Laing, and G.P.J. Janssens. 2016. Biomarkers of selenium status in dogs. *BMC Vet. Res.* 12:1–12. doi:10.1186/s12917-016-0639-2.
- Ziliotto, S., O. Ogle, and K.M. Taylor. 2018. Targeting Zinc (II) Signalling to Prevent Cancer. *Met. Ions Life Sci.* 18.



OBJETIVOS



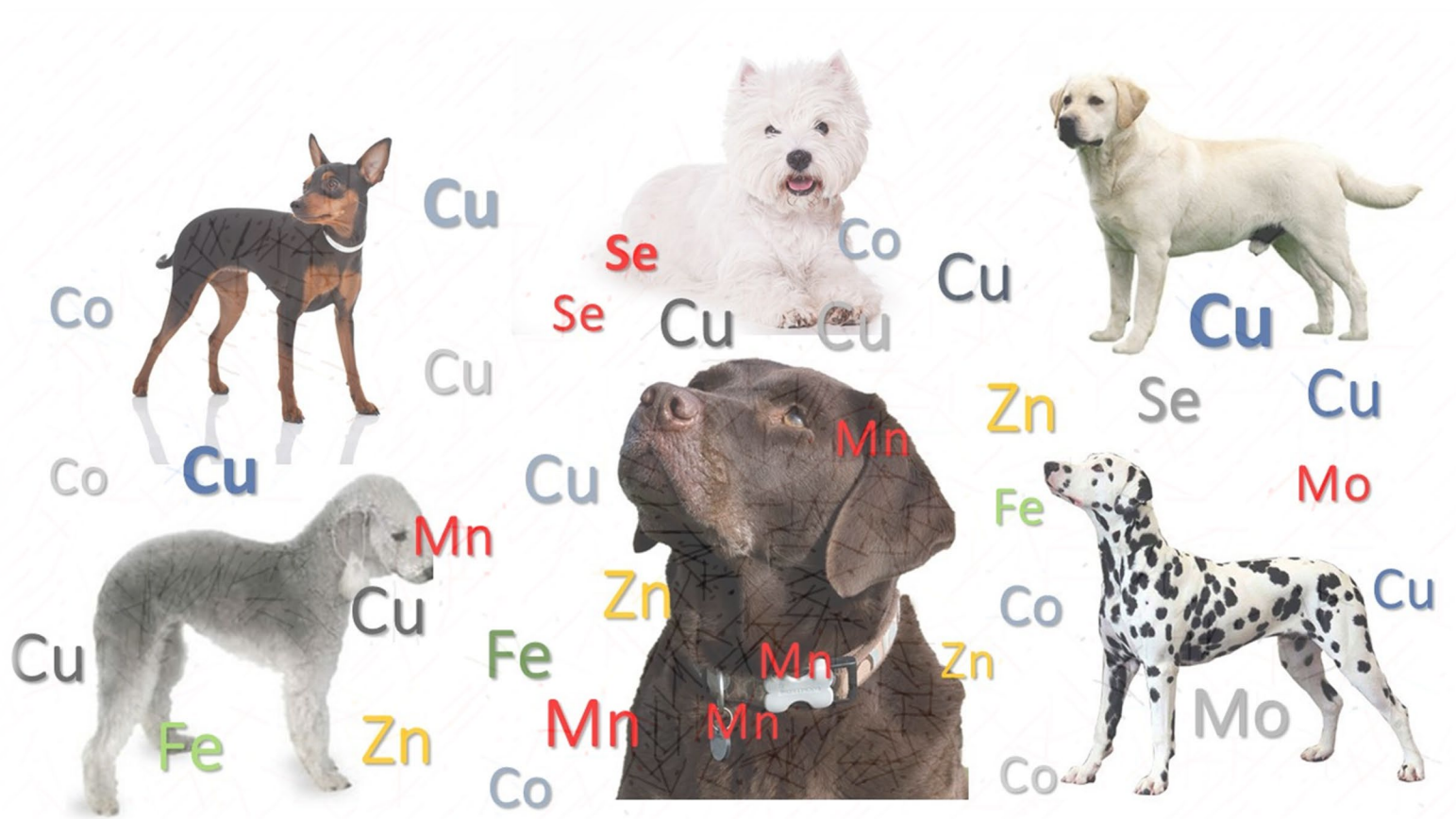
OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es hacer una evaluación del valor diagnóstico del perfil mineral (elementos esenciales y tóxicos) en el perro. Para ello se desarrollarán los siguientes objetivos concretos:

- I. Evaluar las concentraciones de los principales elementos esenciales (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se y Zn) y tóxicos (As, Cd, Hg, Pb) en suero de una muestra representativa (cohorte) de perros en la región norte de España usando un método validado de determinación por ICP-MS con el objetivo de (i) establecer los intervalos de referencia de las concentraciones de elementos esenciales en una población de perros sanos/normales y determinar el nivel de exposición a elementos tóxicos en la región, y (ii) evaluar la potencial relación entre las concentraciones séricas de los elementos determinados y las diferentes patologías encontradas en perros clínicamente afectados.
- II. Proporcionar evidencias del papel de los desequilibrios de elementos traza en la patogénesis de ciertas enfermedades en perros evaluando la idoneidad del perfil de elementos traza junto a otros parámetros bioquímicos mediante análisis quimiométricos como herramientas adicionales en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.
- III. Evaluar la acumulación de Cu en hígado y su interacción con otros elementos esenciales (Co, Fe, Mn, Mo, Se y Zn) y tóxicos (As, Cd, Hg, Pb) en perros afectados con hepatitis crónica y perros sanos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULOS





Capítulo 1

Concentración sérica de elementos esenciales y tóxicos en perros sanos y con diversas patologías

Adaptado de:

Yolanda Cedeño, Marta Miranda, Inmaculada Orjales, Carlos Herrero-Latorre, Maruska Suárez, Diego Luna, Marta López-Alonso. 2020. Serum concentrations of essential trace and toxic elements in healthy and disease-affected dogs. *Animals*

RESUMEN

Este estudio fue diseñado para (i) establecer intervalos de referencia para elementos esenciales en una población de perros sanos y evaluar el nivel de exposición a elementos tóxicos; y (ii) evaluar si las concentraciones de elementos traza varían en animales con diferentes patologías. Se recogieron muestras de sangre de 187 perros, incluyendo animales enfermos y sanos, en el Hospital Veterinario Universitario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela en Lugo, España. Las muestras se procesaron mediante digestión ácida y se determinaron las concentraciones de elementos esenciales (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn) y tóxicos (As, Cd, Hg, Pb) mediante espectrometría de masa con fuente de plasma acoplado (ICP-MS). Este estudio, ha permitido establecer rangos de referencia para elementos esenciales y el nivel de exposición a elementos tóxicos en perros e identificar varias alteraciones clínicas asociadas con variaciones séricas de elementos traza. Se observaron diferencias significativas en comparación con animales sanos para Cu (incremento significativo en categorías hepático, inflamatorio/infeccioso y oncológico), Zn (disminución significativa en categorías gastrointestinal, inflamatorio/infeccioso y renal), Se (disminución significativa en pacientes gastrointestinales), y Mo (incremento significativo en categoría renal). Nuestros resultados indican que, la determinación de elementos traza en suero, puede aportar información útil en la patogenia de ciertas enfermedades (como causa o consecuencia). La investigación sobre la concentración de elementos esenciales en suero, particularmente, en conexión con otros parámetros bioquímicos y herramientas diagnósticas, podría ofrecer información importante en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades en animales.

Palabras clave: elementos traza, metales tóxicos; suero; perro; ICP-MS

1. Introducción

Una nutrición apropiada es esencial para preservar la salud del organismo. Los micronutrientes, incluyendo elementos traza, tienen un rol vital en los continuos procesos regenerativos, en contrarrestar el estrés oxidativo en tejidos y en mantener la inmunidad contra patógenos (Wada, 2004; Bonaventura et al., 2015). Está bien demostrado que las

deficiencias de elementos traza son asociadas con una reducción del potencial antioxidante en organismos (lo cual, posiblemente, precede el desarrollo de cáncer y aterosclerosis), acelera el envejecimiento, retarda el desarrollo en individuos en crecimiento, incrementa la incidencia de alteraciones reproductivas, anormalidades inmunológicas y enfermedades relacionadas con el estilo de vida (Wada, 2004; Bonaventura et al., 2015). Así, desde el punto de vista de medicina preventiva los elementos traza, están centrando la atención, y las dietas son formuladas con concentraciones específicas de elementos esenciales (NRC, 2006). Sin embargo, está también documentado que la sobre nutrición y/o la exposición excesiva a elementos esenciales y tóxicos tienen efectos deletéreos en el organismo. Por ejemplo, el rol del Cu (Fieten et al., 2012; Johnston et al., 2013; Strickland et al., 2018; Webster et al., 2019) y otros elementos (Cedeño et al., 2016) en la hepatitis crónica en perros o las elevadas concentraciones de Fe y Cu (capaces de inducir daño oxidativo) que han sido detectadas en tejido cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer y en el cerebro de humanos y animales afectados por otros desórdenes neurológicos (Deibel et al., 1996; Ward et al., 2014). Un estudio reciente en perros ha sugerido el rol del Mn, Se y Zn en la fisiopatología y/o en el tratamiento de la epilepsia y que la terapia anticonvulsiva puede afectar al metabolismo del Cu y del Mo (Vitale et al., 2019). Es importante tener en cuenta que los elementos traza pueden interactuar y así, en algunas ocasiones, el efecto negativo de un elemento, no es causado por sí solo sino por las interacciones y/o desequilibrios con otros elementos (Suttle, 2010).

A pesar del nivel de conocimiento, uno de los problemas más complejos concernientes a los elementos traza, desde el punto de vista nutricional y clínico, es la dificultad en el diagnóstico de alteraciones de estos elementos, particularmente deficiencias. Incluso en medicina humana, en donde existe gran cantidad de investigaciones realizadas en las últimas décadas, existen pocos métodos que permitan un diagnóstico preciso, especialmente en casos de desequilibrios moderados, tanto deficiencias marginales, como niveles altos, sin llegar a toxicidad (Wada, 2004). En otras especies como el perro, la información sobre las concentraciones de elementos traza en sangre y tejidos es más limitada (principalmente relacionada a hepatitis por acumulación de Cu) y no se han establecido rangos de normalidad. Tradicionalmente, la determinación de las concentraciones de elementos traza en muestras no invasivas como sangre era muy difícil debido a las bajas concentraciones presentes en ésta, lo que hacía la determinación muy imprecisa, cara y laboriosa, por el tiempo consumido. Actualmente, el desarrollo de técnicas multi-elementales (que permiten hacer un barrido de todos los elementos en una sola muestra), como la espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS) con muy bajos límites de detección permite medir en sangre, de forma fiable y precisa los elementos esenciales y tóxicos. Estas nuevas técnicas son más prácticas, rápidas y

económicas. Esto abre una puerta para un mayor conocimiento acerca de los niveles de elementos traza y el diagnóstico de enfermedades.

En el presente estudio, se analizaron las concentraciones de los principales elementos esenciales (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se y Zn) y tóxicos (As, Cd, Hg, Pb) en suero de una muestra representativa (cohorte) de perros en la región norte de España usando un método validado de determinación por ICP-MS. El primer objetivo de este trabajo fue establecer los intervalos de referencia de las concentraciones de elementos esenciales en una población de perros sanos/normales y determinar el nivel de exposición a elementos tóxicos en la región, y el segundo objetivo fue evaluar la potencial relación entre las concentraciones séricas de los elementos determinados y las diferentes patologías encontradas en perros clínicamente afectados.

2. Material y métodos

2.1. Animales y recolección de muestras

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron un total de 187 perros que acudieron al Hospital Veterinario Universitario Rof-Codina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela (Lugo, España) entre noviembre de 2015 y abril de 2017. En todos los casos, los animales fueron considerados al contar con una muestra de sangre para algún procedimiento clínico y tener un diagnóstico definitivo. Un total de 42 animales sanos (machos y hembras), que fueron al hospital para procedimientos de esterilización, fueron considerados como grupo control después de que se les realizara un examen clínico completo y exámenes prequirúrgicos (hematología y bioquímica básica). Los 145 perros restantes, fueron animales clínicamente afectados, los cuales fueron clasificados de acuerdo a la patología que presentaran en los siguientes grupos de enfermedad: cardiopulmonar (CR, n=11), dermatológico (D, n=11), gastrointestinal (GI, n=24), hepático (H, n=25), inflamatorio-infeccioso (II, n=24), neurológico (N, n=13), oncológico (O, n=15), y renal (R, n= 22). El rango de edad de los animales estuvo entre 1.2 y 12.4 años, 52.4% hembras (n= 98) y 47.6% machos (n= 89). La proporción machos/hembras fue similar en todas las categorías patológicas, aproximadamente 50/50.

2.2. Preparación de muestras y análisis por ICP-MS

Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena cefálica, centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos y almacenadas a -20 °C hasta su análisis. Previo a la determinación de elementos esenciales y tóxicos, las muestras de suero fueron procesadas mediante digestión ácida. En tubos de polipropileno se añadió 1ml de HNO₃ y 0.5ml de H₂O₂ a un volumen de 0.5 ml de suero. Las muestras se mantuvieron a 60°C durante 2 horas para

digestión. Las muestras digeridas fueron diluidas con 2.5ml de agua ultra pura y centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos. Se realizó la determinación de las concentraciones de los elementos esenciales (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se y Zn) y tóxicos (As, Cd, Hg y Pb) en el sobrenadante, mediante ICP-MS en un equipo Agilent 7700x ICP-MS system (Agilent Technologies, Tokyo, Japan). Los detalles de la técnica analítica se desarrollan en detalle en un trabajo previo (Luna et al., 2019b).

Para la verificación de los resultados obtenidos, se realizó un programa de control de calidad analítica durante todo el presente estudio. En todos los lotes, se incluyó un blanco analítico (preparado con el mismo procedimiento aplicado a las muestras de suero). Los resultados correspondientes fueron empleados para el cálculo de los límites de detección (LOD) para cada elemento determinado. El LOD fue calculado como 3 veces la desviación estándar del blanco. Los LOD obtenidos fueron lo suficientemente bajos como para permitir la determinación de la mayoría de los elementos considerados en las muestras de suero. La precisión del método fue avalada usando un material de referencia certificado (CRM) de suero animal NIST-1598a (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MA, USA), así como un set de muestras añadidas a un nivel de concentración conocido (entre 2–10 veces mayor que los niveles normales en las muestras). Se alcanzaron buenos porcentajes de recuperación, en el rango de 90 – 110% tanto para el CRM como para las muestras añadidas. Además, la precisión intra-ensayo (evaluada con 10 lecturas repetidas de la misma muestra) y la precisión inter-ensayo (evaluada mediante preparación y lectura de 10 digestiones de la misma muestra) fueron también determinadas con resultados satisfactorios. Un resumen de los resultados del programa de control de calidad se presenta en la **Tabla 1**.

2.3. Análisis de datos e intervalos de referencia

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con Statgraphics Centurion XVIII, ver. 18.1.12 (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA). La distribución normal de los datos fue comprobada mediante el test Kolmogorov-Smirnov (K-S). La influencia de la patología en la concentración de los elementos traza y tóxicos fue evaluada mediante ANOVA o test de Kruskal-Wallis (K-W). Las correlaciones entre elementos fueron determinadas mediante coeficiente de correlación de Pearson. Todos los análisis fueron considerados significativos con un valor $P < 0.05$.

En química clínica, el rango de referencia (o intervalo de referencia) para una variable, es el rango de valores de esta variable que se considera normal en animales sanos. Este rango de referencia para una variable en particular es el intervalo que incluye el 95% de valores de una población de referencia y excluye el 2.5% de los valores al final de cada lado del rango. Los límites de este rango, límite inferior de referencia (LIR) y límite superior de referencia (LSR), pueden ser estimados por métodos estadísticos paramétricos o no

paramétricos para distribuciones normales (Gaussianas) o no- normales, respectivamente. En este caso, después del test K-S, si la variable considerada j presenta una distribución normal, el LIR y el LSR fueron calculados como: $\bar{X}_j - 1.96 DS_j$ y $\bar{X}_j + 1.96 DS_j$, respectivamente, donde \bar{X}_j es el promedio de la variable j y DS_j es su desviación estándar; por otro lado, si la variable sigue una distribución no-normal, entonces LIR y LSR fueron obtenidos como los percentiles 2.5% y 97.5%.

Tabla 1. Resultados del programa de control de calidad analítica para la determinación de elementos esenciales y tóxicos por ICP-MS en suero de perros en el presente estudio.

Elemento	Límite detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Animal Serum NIST 1598a		Muestras añadidas
		Valor certificado* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)	Recuperación* (%)
Co	0.027	1.24 \pm 0.07	93.3 \pm 5.6	95.1 \pm 6.7
Cu	0.051	1580 \pm 90	92.5 \pm 2.5	104 \pm 2
Fe	0.053	1680 \pm 60	102 \pm 8	106 \pm 10
Mn	0.026	1.78 \pm 0.33	112 \pm 13	100 \pm 7
Se	0.080	134.4 \pm 5.8	97.8 \pm 2.3	99.1 \pm 7.7
Zn	0.620	880 \pm 24	95.8 \pm 3.1	101 \pm 8
Cr	0.025	0.33 \pm 0.08	91.2 \pm 5.1	91.8 \pm 4.4
Mo	0.011	5.5 \pm 1.0	98.3 \pm 3.7	95.7 \pm 6.0
Ni	0.024	0.94 \pm 0.18	97.5 \pm 4.8	103 \pm 7
As	0.039	(0.3)	86.1 \pm 6.9	93.8 \pm 7.4
Cd	0.014	0.048 \pm 0.004	ND	106 \pm 8
Hg	0.019	0.32 \pm 0.19	94.1 \pm 4.7	89.1 \pm 8.4
Pb	0.015	--		102 \pm 7

*Expresado como media \pm DS. En paréntesis valores indicativos. ND no detectado.

3. Resultados y discusión

3.1. Intervalos de referencia para elementos esenciales y niveles de exposición a elementos tóxicos.

En la **tabla 2** se presentan las concentraciones y los intervalos de referencia de elementos esenciales y tóxicos en el presente estudio. Los intervalos de referencia se calcularon, como se indicó en la sección 2.3, en función de si seguían una distribución normal o no normal.

Tabla 2. Estadística descriptiva e intervalos de referencia calculados para las concentraciones de elementos esenciales y tóxicos en suero de perros sanos (n=42). (Todos los resultados están expresados en $\mu\text{g L}^{-1}$).

Elemento	Media	DS	Mediana	Distribución normal (K-S test)	Límite inferior referencia	Límite superior referencia
Co	0.10	0.07	0.07	NO	0.07	0.28
Cu	422	148	377	SI	132	712
Fe	1938	639	1939	SI	686	3190
Mn	3.79	1.86	3.47	SI	0.14	7.44
Se	315	82	310	SI	154	447
Zn	489	143	464	SI	209	769
Cr	2.73	2.54	2.17	NO	0.63	13.7
Mo	5.48	3.36	4.35	SI	0.00	12.1
Ni	0.72	0.94	0.06	NO	0.06	3.01
As	1.86	1.44	1.36	NO	0.22	7.89
Cd	ND	----	----	----	----	----
Hg	0.24	0.22	0.16	SI	0.0	0.67
Pb	0.55	0.60	0.30	SI	0.0	1.73

ND: no detectado

La información de las concentraciones de elementos traza en suero o plasma en perros es escasa y los intervalos de referencia no están disponibles en la literatura. Para nuestro conocimiento, el único intento de proporcionar rangos normales o de referencia en suero de perros fue realizado hace más de veinte y cinco años por Puls, en 1994, en su libro *Mineral Levels in animal Health*, pero la información proporcionada se limita a los principales elementos, y la falta de conocimiento sobre el origen de estos datos (incluyendo técnica de análisis, límites de detección y otros datos analíticos relevantes) condiciona su uso para fines comparativos. Al considerar los micro-elementos esenciales, las concentraciones de Cu, Fe, Se, y Zn en suero de perro en el presente estudio, están en razonable concordancia con los rangos normales/adecuados descritos por Puls para perros (Puls R, 1994), así como con otros estudios publicados en la literatura para esta especie animal a partir de estudios observacionales (tanto para la población general de perros como para grupos control con pacientes sanos; ver Tabla 3). Estos valores también concuerdan con rangos normales en humanos (Forrer et al., 2001) y en otras especies de animales de abasto, para las cuales existe mayor información (Puls R, 1994; Herdt and Hoff, 2011). Estos resultados eran los esperados, ya que en animales sanos que reciben dietas adecuadas (la mayoría de perros usados como control en este estudio eran alimentados con dietas comerciales, equilibradas y fortificadas con minerales traza), las concentraciones de micro elementos están estrictamente reguladas por mecanismos homeostáticos. Por ejemplo, en suero/plasma, el Cu está unido en un 60-70% a la ceruloplasmina, que corresponde al Cu proveniente del hígado hacia los tejidos; el resto del Cu está asociado a la proteína de transporte transcupreína en un 10-30% y a albúmina en un 15-20%; el cual representa el Cu proveniente del intestino hacia el hígado y riñón (Liu et al., 2007; Wu et al., 2016).

Por otro lado, las concentraciones de Mn en perros en el presente estudio, se encontraron muy por debajo de las consideradas como adecuadas por Puls (Puls R, 1994) (en 1 orden de magnitud) y otros estudios en perros (por encima de 1-2 orden de magnitud, ver Tabla 3), pero en concordancia con aquellas descritas en estudios en perros (Vitale et al., 2019), humanos (Forrer et al., 2001) y rumiantes (Herdt and Hoff, 2011), utilizando técnicas analíticas multi elementales más modernas, como ICP-MS, con límites de detección muy bajos. Un escenario similar se describe para el Co, donde la información en perros es aún más escasa (no se proveen datos en Puls, 1994).

Tabla 3. Concentraciones de elementos esenciales y tóxicos en suero en perro (expresados en $\mu\text{g L}^{-1}$ y medias aritméticas).

Tipo estudio/país	N	Elemento											Referencias		
		As	Cd	Co	Cu	Cr	Fe	Mn	Hg	Mo	Ni	Pb		Se	Zn
Valores de referencia ¹		3-5 ^a			200-800		940-1220	20			1.8-4.2	10-100 ^a	220 ^a	700-2000	Puls
<i>Estudio poblacional</i>															
Turquía ¹	73			24	830		1320	10			13	100		730	2
Polonia ^{2,b}	48	556			1363	249	1690	683				489		1523	3
Italia ^{2,c}	31	390			780	130		20	510		230	60	230	1970	4
<i>Perros control sanos</i>															
India ¹	10			36.6±3.6	1050±21		872±21	172±2						642±10	5
USA ^{3,d}	50			0.30	450		1625	3.15		8.45			300	740	6
Bulgaria ²	10				946±143			24±5					291±57	1692±180	7
Turquía ⁴	10				1006±12		860±199							620±76	8
USA ^{1,4}	50					4.66±2.83	1751±567						1220±360		9
Turquía ^{4,b}	16				511±59		1543±240	20±1							10
Iran ⁴	14				1514±255		1730							593±226	11

N: número de muestras. ^a sangre entera; ^b área urbana, ^c área contaminada, ^d mediana

Técnica analítica: Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA); ² Espectroscopía de Emisión con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-OES); ³ Espectroscopía de Masas con Fuente de Plasma Acoplado; ⁴ Espectroscopía UV

Referencias: 1 (Puls R, 1994); 2 (Mert et al., 2008); 3 (Tomza-Marciniak et al., 2012); 4 (Zaccaroni et al., 2014); 5 (Dash et al., 2018); 6 (Vitale et al., 2019); 7 (Enginler et al., 2015); 8 (Seyrek et al., 2009); 9 (Kazmierski et al., 2001); 10 (Kim et al., 2012); 11 (Soltanian et al., 2016)

Se debe tener en cuenta que las concentraciones de Co (media: 0.10 µg/L) y Mn (media: 3.79 µg/L), son muy bajas en suero comparadas con otros tejidos y están muy cerca a los límites de detección de la técnica analítica, en este caso, llevar a cabo un buen programa de control de calidad analítica, que incluya material de referencia certificado, es esencial para garantizar un buen análisis de muestra. De hecho, los niveles de Co y Mn en nuestro estudio están en el mismo rango del único estudio en perros que utilizó, como en nuestro caso análisis por ICP-MS (Vitale et al., 2019) (ver Tabla 3).

En todas las especies animales, es muy limitada la información precisa sobre los elementos considerados como beneficiosos solo ocasionalmente (excepto el Mo en rumiantes por su particular antagonismo con el Cu (Suttle, 2010)). Estos elementos son esenciales solo en concentraciones “ultra traza”, muy por debajo de las encontradas en dietas normales, y solo se han evidenciado sus deficiencias en condiciones experimentales, cuando los animales reciben dietas purificadas de estos elementos (Suttle, 2010). Las concentraciones séricas mínimas necesarias para mantener un metabolismo normal no están bien definidas, pero se supone que están muy por debajo de las encontradas en el suero. En nuestro estudio, las concentraciones de Cr, Mo, y Ni están en el rango inferior de las descritas en estudios recientes usando técnicas analíticas con bajos límites de detección (ICP-MS) (ver Tabla 3). Finalmente, al considerar los elementos tóxicos, Las concentraciones de As, Pb y Hg fueron muy bajas (niveles máximos de residuos de 7.89; 0.66 y 1.72 µg/L, respectivamente), y en el caso del Cd, todas las muestras estuvieron por debajo de los límites de detección de la técnica. Resultados similares en términos de concentración se han encontrado en estudios en humanos (Forrer et al., 2001) y en un estudio en ganado vacuno llevado a cabo en la misma región geográfica (Luna et al., 2019a), lo cual indica un nivel bajo de exposición medioambiental en esta región de España.

3.2. Concentraciones de elementos esenciales y tóxicos en perros con diferentes patologías

La descripción detallada de las concentraciones de elementos traza en perros en relación a la patología que padecen se presenta en las Figuras 1 (elementos esenciales) y 2 (elementos condicionalmente esenciales y tóxicos). Mediante los cálculos ANOVA, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los principales elementos traza para diferentes grupos patológicos comparados con el grupo control ($P < 0.05$): Cu (incremento significativo en categorías hepático, inflamatorio/infeccioso y oncológico), Zn (disminución significativa en categorías gastrointestinal, inflamatorio/infeccioso y renal), Se (disminución significativa en pacientes gastrointestinales), y Mo (incremento significativo en categoría renal).

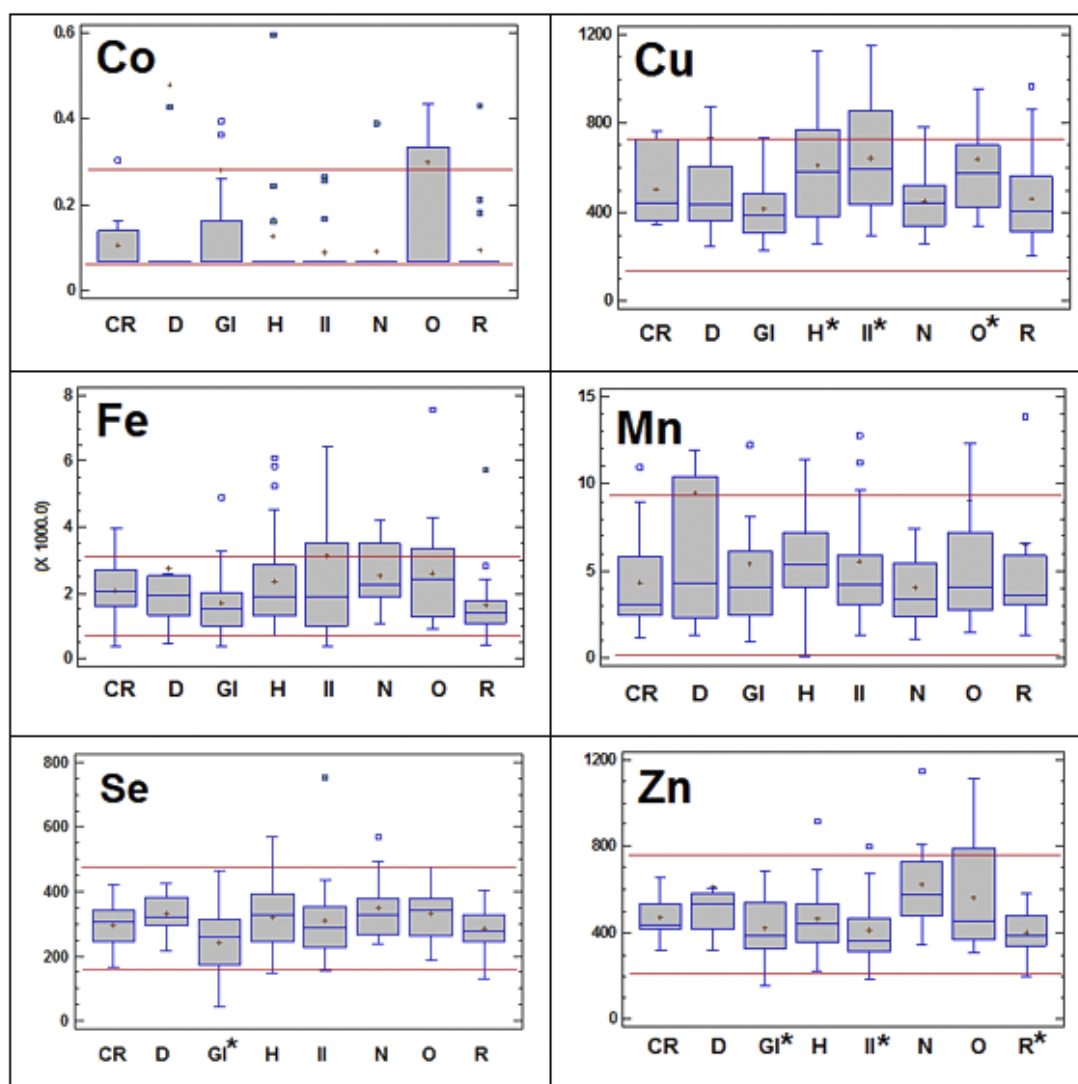


Figura 1. Diagrama de caja y bigotes que muestran los niveles de Co, Cu, Fe, Mn, Se y Zn en suero de perros que presentan patologías cardiorespiratorias (CR), dermatológicas (D), gastrointestinales (GI), hepáticas (H), inflamatorio-infecciosas (II), neurológicas (N), oncológicas (O) y renales (R). Todas las concentraciones están expresadas en $\mu\text{g L}^{-1}$. Las líneas rojas son LRI y LRS del intervalo de referencia para cada variable obtenido del grupo control. Para cada diagrama, la línea azul horizontal dentro de la caja simboliza la mediana; la cruz en rojo es la media aritmética; y los bordes inferior y superior de la caja representan el primer y tercer cuartil (por lo tanto, la caja es el intervalo que contiene el 50% medio de los valores de los datos). Los bigotes representan los valores máximo y mínimo. Los valores fuera de este rango están representados por un punto azul cuadrado. *Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($P < 0.05$).

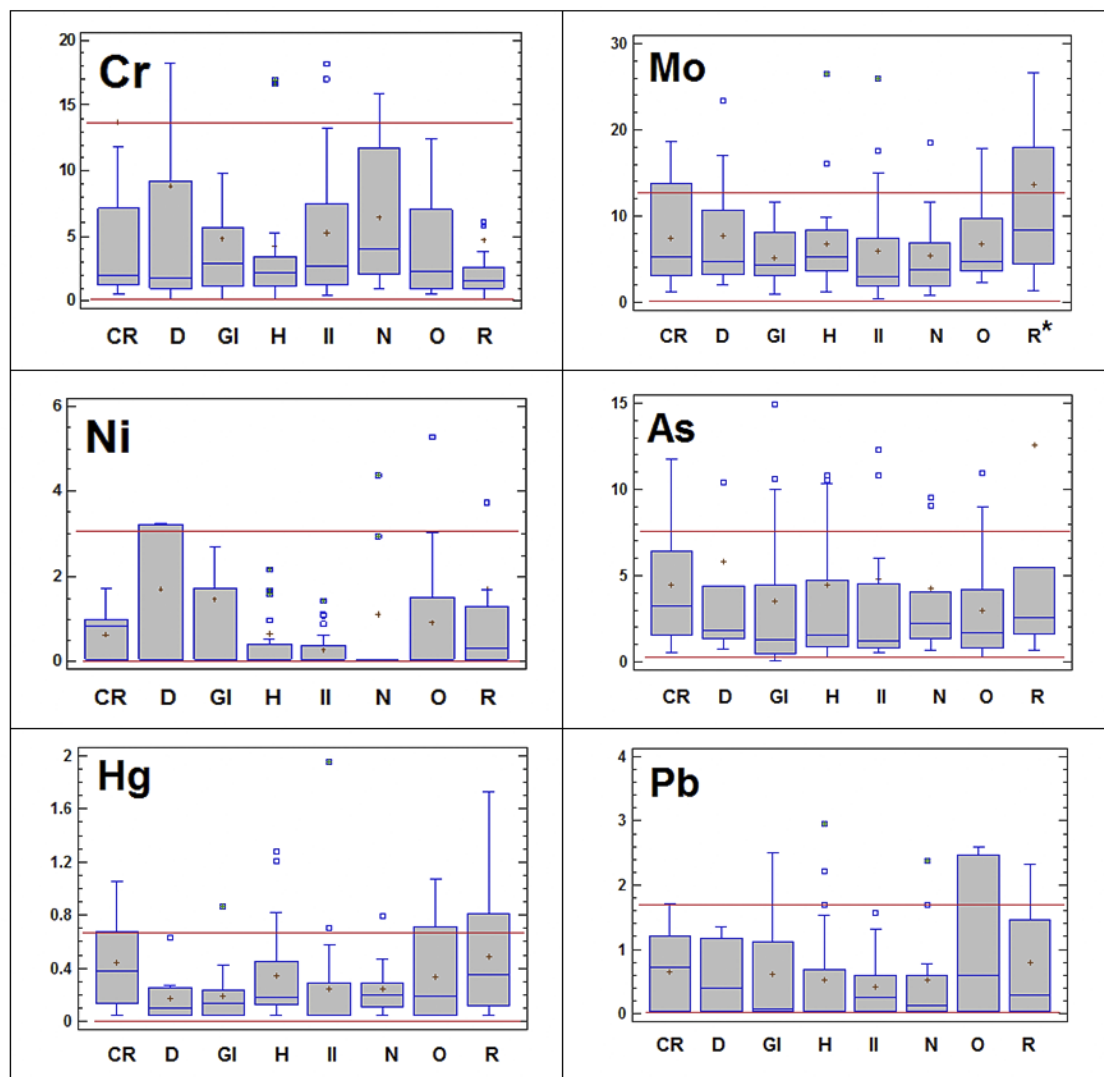


Figura 2. Diagrama de caja y bigotes que muestran los niveles de Cr, Mo, Ni, As, Hg y Pb en suero de perros que presentan patologías cardiorespiratorias (CR), dermatológicas (D), gastrointestinales (GI), hepáticas (H), inflamatorio-infecciosas (II), neurológicas (N), oncológicas (O) y renales (R). Todas las concentraciones están expresadas en $\mu\text{g L}^{-1}$. Las líneas rojas son LRI y LRS del intervalo de referencia para cada variable obtenido del grupo control. Para cada diagrama, la línea azul horizontal dentro de la caja simboliza la mediana; la cruz en rojo es la media aritmética; y los bordes inferior y superior de la caja representan el primer y tercer cuartil (por lo tanto, la caja es el intervalo que contiene el 50% medio de los valores de los datos). Los bigotes representan los valores máximo y mínimo. Los valores fuera de este rango están representados por un punto azul cuadrado. *Indica diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control ($P < 0.05$).

La mayoría de los cambios descritos en el apartado anterior en relación a las concentraciones séricas de elementos en condiciones patológicas han sido descritos previamente en la literatura (principalmente en humanos) y en algunos casos, estas variaciones se han propuesto como marcadores de enfermedad y como indicativas de pronóstico de los pacientes (Bhogade et al., 2013; Nangliya et al., 2015). La mayor cantidad de información se encuentra disponible para el Cu; está bien documentado que en perros con alteraciones hepáticas existe acumulación excesiva de Cu (Fieten et al., 2012; Johnston et al., 2013; Cedeño et al., 2016; Strickland et al., 2018; Webster et al., 2019). Las concentraciones séricas de Cu también son mayores en seres humanos con enfermedades hepáticas (Nangliya et al., 2015), y la elevación del ratio Cu/Zn en pacientes con cirrosis hepática (Nangliya et al., 2015), o carcinoma hepatocelular (Lin et al., 2006) ha sido propuesta como marcador de la enfermedad. Es bien conocido en humanos (Strecker et al., 2013) y perros (Seyrek et al., 2009), el rol de la proteína de fase aguda ceruloplasmina en el control de enfermedades inflamatorias-infecciosas agudas, produciendo una elevación marcada de las concentraciones séricas de Cu. Existen evidencias de incremento en suero de Cu y disminución de Fe y Zn en perros infectados con *Hepatozoon canis* (Seyrek et al., 2009) y con *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) (Da Silva et al., 2012). En humanos, las concentraciones séricas de Cu se incrementan en varios carcinomas (Zowczak et al., 2001). Igualmente, en perros, en un estudio reciente sobre las concentraciones de Cu y otros elementos traza en hígado de animales con carcinoma hepatocelular se encontró un incremento en los niveles de Cu con disminución del Fe, Se y Zn hepático en los individuos afectados (Harro et al., 2019). Tanto en modelos animales como en humanos se han observado cambios en las concentraciones séricas y tisulares de Cu y Zn en individuos con neoplasias (Zowczak et al., 2001; Lin et al., 2006; Nangliya et al., 2015; Harro et al., 2019), y hasta el momento, no se ha establecido, si las alteraciones en las concentraciones de Cu y Zn son principalmente una causa o efecto de malignidad. Además, la utilidad de la determinación de Zn y Cu en suero, para detección temprana y prevención de cáncer, monitorización de tratamientos y pronóstico requiere mayor investigación.

En conexión con lo anterior, una gran variedad de enfermedades inflamatorias gastrointestinales se asocian con deficiencia o alteración en el metabolismo del Zn (Panda et al., 2009). Estos autores, describieron que los niveles sanguíneos de Zn disminuyen en perros con diarrea. Las enfermedades diarreicas agudas y crónicas pueden causar deficiencia de Zn, ya sea por incremento en la pérdida, inmunidad alterada o disminución de su absorción. Cuando se altera la barrera intestinal por inflamación, la suplementación con Zn puede ser beneficiosa, no solo para evitar deficiencias, sino también, porque mejora la capacidad del intestino delgado para absorber agua y electrolitos (Sturniolo et al., 2000). Está bien establecido que la deficiencia de Zn incrementa la inflamación y

consecuentemente muchas patologías inflamatorias son caracterizadas por alteraciones en la homeostasis de este elemento (Bonaventura et al., 2015).

Adicionalmente, las concentraciones séricas de Zn se encuentran disminuidas en pacientes humanos con alteraciones renales como síndrome nefrótico e insuficiencia renal asociado con tratamientos de diálisis (Bhogade et al., 2013). La excreción urinaria de Zn se incrementa y los síntomas de deficiencia son comunes en estos pacientes. Sigue sin esclarecerse si estos estados de enfermedad son indicativos de una verdadera deficiencia de Zn, sintomática o asintomática, o si simplemente reflejan una disminución en las proteínas que unen Zn. La disminución de las concentraciones séricas de Zn y la alta tasa de excreción en pacientes con síndrome nefrótico no parece ser debido a la pérdida de Zn unido a proteínas urinarias.

Por otra parte, las concentraciones séricas de Mo se incrementan en perros con enfermedad renal. Esto puede estar relacionado con el ratio de excreción renal de Mo, ya que esta es principal ruta de excreción de este elemento. En un estudio reciente en perros y gatos con nefritis intersticial crónica se observó que el ratio de excreción urinaria de Mo a través de la orina era menor que en animales sanos (Alborough et al., 2020). En humanos se ha postulado que las elevadas concentraciones de este elemento en sangre podrían contribuir al desarrollo de enfermedad ósea relacionada con la diálisis en pacientes que requieren esta terapia a largo plazo ya que la acumulación masiva de Mo causa deformidades articulares y artritis (Manuti et al., 2011).

Es bien conocido también que en pacientes con enfermedades gastrointestinales severas ocurre deficiencia de Se, la cual se atribuye principalmente a mala absorción. En pacientes humanos que requirieron nutrición parenteral por insuficiencia intestinal fue general la deficiencia de Se (Rannem et al., 1998). En la patogénesis de las enfermedades intestinales en perros, ha sido implicado el estrés oxidativo (Panda et al., 2009), este hecho incrementa las necesidades de Se agravando su deficiencia.

Además, al analizar en detalle las Figuras 1-2 vale la pena señalar que en las patologías descritas anteriormente donde existe un aumento estadísticamente significativo de micro minerales en el suero (Cu en hepático, inflamatorio/infeccioso y oncológico y Mo en renal), más del 25% de los animales mostraron valores por encima del rango normal superior. Este hecho requiere mayor investigación ya que los elementos traza en suero podrían ser utilizados con fines diagnósticos.

Aunque sin diferencia estadística, el mismo patrón de comportamiento se observó para otros elementos en algunas patologías, que igualmente han sido descritos en la literatura. Cabe resaltar que más del 25% de pacientes que sufren procesos oncológicos presentan concentraciones séricas de Co, Fe, Zn, Hg y Pb superiores al rango máximo normal. Además

del Cu, muchos estudios observacionales han encontrado una relación entre las concentraciones séricas de Co (Kazantzis, 1981; Jensen and Tuchsén, 1990; Suh et al., 2016) y Fe (Wu et al., 2004; Fonseca-Nunes et al., 2014) y desarrollo tumoral. Por otra parte, existe poca evidencia sobre el potencial carcinógeno del Hg y del Pb. Debido a que el Pb está altamente correlacionado con el Cu ($r=0.89$, $P<0.001$) y el Hg con el Fe ($r=0.69$, $P<0.001$) en nuestro estudio, es posible que la exposición a estos metales pudiera ocurrir en conjunto en estos individuos. La presencia de altos niveles séricos de Zn en animales con enfermedades oncológicas en nuestro estudio fue inesperada, ya que las elevadas concentraciones de Zn en suero, no se han asociado con el desarrollo de cáncer en la literatura; al contrario, los altos niveles de Zn en suero son considerados como un factor de protección contra el desarrollo de tumores (Ho, 2004; Khayatzadeh et al., 2015).

Llama la atención el hecho de que se observaron concentraciones séricas de Ni y Mn por encima del límite superior en una alta proporción de perros con problemas dermatológicos. En humanos existe bastante evidencia en la literatura sobre la dermatitis por contacto asociada a Ni (Purello D'ambrosio et al., 1998; Torres et al., 2009) y, en menor extensión, se ha reportado dermatitis por contacto con Mn (Leis Dosil et al., 2006; Tuchinda et al., 2014).

Finalmente, merece especial atención la presencia de concentraciones séricas de Fe por encima del rango normal en una gran proporción de individuos con afecciones inflamatorias y neurológicas. El riesgo de estos pacientes está bien documentado. Las enfermedades asociadas con exceso de Fe, pueden incrementar el riesgo de infección, debido a que, el Fe es un requerimiento esencial para la multiplicación bacteriana en el hospedador y estudios microbiológicos muestran una estrecha relación entre la disponibilidad de Fe y la virulencia bacteriana. La administración de Fe parenteral ha demostrado ser contraproducente, tanto en humanos como en animales con cuadros infecciosos (Ganz, 2018). El Fe cumple varios procesos biológicos fundamentales incluyendo transporte de oxígeno, síntesis de ADN, respiración mitocondrial, síntesis de mielina y síntesis y metabolismo de neurotransmisores. Un estudio reciente sobre las concentraciones séricas de oligoelementos en perros epilépticos describió niveles más altos de Fe en perros epilépticos no tratados en comparación con perros sanos y epilépticos con tratamiento (Vitale et al., 2019). La homeostasis de Fe es necesaria para mantener una función cerebral fisiológica, su alteración puede causar neurotoxicidad, y cuando las concentraciones de Fe exceden la capacidad celular de secuestro y de almacenamiento de Fe unido a proteínas u otras moléculas, la concentración de Fe en el compartimento lábil puede incrementar, lo cual puede ser perjudicial (Murray-Kolb, 2013; Ward et al., 2014).

4. Conclusiones

Los niveles de elementos esenciales y metales tóxicos en suero en una cohorte representativa de perros (región norte de España) ha sido utilizada para establecer rangos de elementos esenciales y el umbral de toxicidad para esta especie animal. Además, se identificaron varias alteraciones clínicas asociadas a variación en los niveles séricos de elementos esenciales. Los patrones de estas variaciones han sido descritos previamente en estudios en medicina humana, donde está disponible una mayor cantidad de información. Nuestros resultados, aunque preliminares, indican que la determinación en suero de elementos esenciales puede aportar información útil en la patogénesis de ciertas enfermedades (como causa o consecuencia). Se necesitan nuevos estudios sobre la concentración de elementos traza en suero y particularmente, en conexión con otros parámetros bioquímicos y herramientas diagnósticas podría ofrecer información importante en el diagnóstico y pronóstico de enfermedad en perros.

Referencias

- Alborough, R., L. Grau-Roma, S. de Brot, G. Hantke, S. Vazquez, and D.S. Gardner. 2020. Renal accumulation of prooxidant mineral elements and CKD in domestic cats. *Sci. Rep.* 10:3160. doi:10.1038/s41598-020-59876-6.
- Bhogade, R.B., A.N. Suryakar, and N.G. Joshi. 2013. Effect of Hemodialysis on Serum Copper and Zinc Levels in Renal Failure Patients. *Eur. J. Gen. Med.* 10:154–157. doi:10.29333/ejgm/82248.
- Bonaventura, P., G. Benedetti, F. Albarède, and P. Miossec. 2015. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun. Rev.* 14:277–285. doi:10.1016/j.autrev.2014.11.008.
- Cedeño, Y., M. López-Alonso, and M. Miranda. 2016. Hepatic concentrations of copper and other metals in dogs with and without chronic hepatitis. *J. Small Anim. Pract.* 57:703–709. doi:10.1111/jsap.12591.
- Da Silva, A.S.; França, R.T.; Costa, M.M.; Paim, C.B. V.; Paim, F.C.; Santos, C.M.M.; Flores, E.M.M.; Eilers, T.L.; Mazzanti, C.M.; Monteiro, S.G.; et al. Influence of *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) on Copper, Iron, and Zinc Bloodstream Levels in Experimentally Infected Dogs. *J. Parasitol.* 2012, 98, 1018–1020.
- Dash, S.K., C. Singh, and G. Singh. 2018. Mineral status in female dogs with malignant mammary gland tumors fed with different habitual diets. *Explor. Anim. Med. Res.* 8:59–63.
- Deibel, M.A., W.D. Ehmann, and W.R. Markesbery. 1996. Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: Possible relation to oxidative stress. *J. Neurol. Sci.* 143:137–142. doi:10.1016/S0022-510X(96)00203-1.
- Enginler, S.O., T.S.F. Toydemir, A. Ates, B. Ozturk, O. Erdogan, S. Ozdemir, I. Kirsan, M.E. Or, S.S. Arun, and U.B. Barutcu. 2015. Examination of oxidative/antioxidative status and trace element levels in dogs with mammary tumors. *Bulg. J. Agric. Sci.* 21:1086–1091.

- Fieten, H., P.A.J. Leegwater, A.L. Watson, and J. Rothuizen. 2012. Canine models of copper toxicosis for understanding mammalian copper metabolism. *Mamm. Genome* 23:62–75. doi:10.1007/s00335-011-9378-7.
- Fonseca-Nunes, A., P. Jakszyn, and A. Agudo. 2014. Iron and cancer risk-a systematic review and meta-analysis of the epidemiological evidence. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23:12–31. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-0733.
- Forrer, R., K. Gautschi, and H. Lutz. 2001. Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS. *Biol. Trace Elem. Res.* 80:77–93. doi:10.1385/BTER:80:1:77.
- Ganz, T. 2018. Iron and infection. *Int. J. Hematol.* 107:7–15. doi:10.1007/s12185-017-2366-2.
- Harro, C.C., R.C. Smedley, J.P. Buchweitz, and D.K. Langlois. 2019. Hepatic copper and other trace mineral concentrations in dogs with hepatocellular carcinoma. *J. Vet. Intern. Med.* 33:2193–2199. doi:10.1111/jvim.15619.
- Herd, T.H., and B. Hoff. 2011. The Use of Blood Analysis to Evaluate Trace Mineral Status in Ruminant Livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27:255–283. doi:10.1016/J.CVFA.2011.02.004.
- Ho, E. 2004. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J. Nutr. Biochem.* 15:572–578. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.07.005.
- Jensen, A.A., and F. Tuchsén. 1990. Cobalt exposure and cancer risk. *Crit. Rev. Toxicol.* 20:427–439. doi:10.3109/10408449009029330.
- Johnston, A.N., S.A. Center, S.P. McDonough, J.J. Wakshlag, and K.L. Warner. 2013. Hepatic copper concentrations in labrador retrievers with and without chronic hepatitis: 72 cases (1980-2010). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 242:372–380. doi:10.2460/javma.242.3.372.
- Kazantzis, G. 1981. Role of cobalt, iron, lead, manganese, mercury, platinum, selenium, and titanium in carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* Vol. 40:143–161. doi:10.2307/3429228.
- Kazmierski, K.J., G.K. Ogilvie, M.J. Fettman, S.E. Lana, J.A. Walton, R.A. Hansen, K.L. Richardson, D.W. Hamar, C.L. Bedwell, G. Andrews, and S. Chavey. 2001. Serum zinc, chromium, and iron concentrations in dogs with lymphoma and osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 15:585–588. doi:10.1111/j.1939-1676.2001.tb01595.x.
- Khayyat-zadeh, S.S., Z. Maghsoudi, M. Foroughi, G. Askari, and R. Ghiasvand. 2015. Dietary intake of Zinc, serum levels of Zinc and risk of gastric cancer: A review of studies.. *Adv. Biomed. Res.* 4:118. doi:10.4103/2277-9175.157849.
- Kim, M.J., H.J. Oh, J.E. Park, G.A. Kim, E.J. Park, G. Jang, and B.C. Lee. 2012. Effects of mineral supplements on ovulation and maturation of dog oocytes. *Theriogenology* 78:110–115. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.01.026.
- Leis Dosil, V.M., R. Cabeza Martinez, R.M. Suarez Fernandez, and P. Lazaro Ochaíta. 2006. Allergic contact dermatitis due to manganese in an aluminium alloy. *Contact Dermatitis* 54:67–68. doi:10.1111/j.0105-1873.2006.0729i.x.
- Lin, C.C., J.F. Huang, L.Y. Tsai, and Y.L. Huang. 2006. Selenium, iron, copper, and zinc levels and copper-to-zinc ratios in serum of patients at different stages of viral hepatic diseases. *Biol. Trace Elem. Res.* 109:15–23. doi:10.1186/1742-2094-3-15.

- Liu, N., L.S. Li Lo, S.H. Askary, L.T. Jones, T.Z. Kidane, T.T.M. Nguyen, J. Goforth, Y.H. Chu, E. Vivas, M. Tsai, T. Westbrook, and M.C. Linder. 2007. Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. *J. Nutr. Biochem.* 18:597–608. doi:10.1016/j.jnutbio.2006.11.005.
- Luna, D., M. López-Alonso, Y. Cedeño, L. Rigueira, V. Pereira, and M. Miranda. 2019a. Determination of Essential and Toxic Elements in Cattle Blood: Serum vs Plasma. *Animals* 9:465. doi:10.3390/ani9070465.
- Luna, D., M. Miranda, A.H.H. Minervino, V. Piñeiro, C. Herrero-Latorre, and M. López-Alonso. 2019b. Validation of a simple sample preparation method for multielement analysis of bovine serum. *PLoS One* 14. doi:10.1371/journal.pone.0211859.
- Manuti, J.K., F.G. Al-Rabii, and M.S. Khudayr. 2011. Serum concentration of molybdenum in chronic renal failure patients requiring hemodialysis. *J. Fac. Med. Baghdad* 53:393–395.
- Mert, H., N. Mert, I. Dogan, M. Cellat, and S. Yasar. 2008. Element status in different breeds of dogs. *Biol. Trace Elem. Res.* 125:154–159. doi:10.1007/s12011-008-8160-5.
- Murray-Kolb, L.E. 2013. Iron and brain functions. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 16:703–707. doi:10.1097/MCO.0b013e3283653ef8.
- Nangliya, V., A. Sharma, D. Yadav, S. Sunder, S. Nijhawan, and S. Mishra. 2015. Study of Trace Elements in Liver Cirrhosis Patients and Their Role in Prognosis of Disease. *Biol. Trace Elem. Res.* 165:35–40. doi:10.1007/s12011-015-0237-3.
- NRC Nutrient Requirements of Dogs and Cats; National Academies Press: Washington, D.C., 2006; ISBN 978-0-309-08628-8.
- Panda, D., R.C. Patra, S. Nandi, and D. Swarup. 2009. Oxidative stress indices in gastroenteritis in dogs with canine parvoviral infection. *Res. Vet. Sci.* 86:36–42. doi:10.1016/J.RVSC.2008.05.008.
- Puls R. 1994. Mineral Levels in Animal Health. second. Clearbrook: Sherpa International, Canada.
- Purello D'ambrosio, F., G.F. Bagnato, B. Guarneri, A. Musarra, G. Di Lorenzo, G. Dugo, and L. Ricciardi'. 1998. The role of nickel in foods exacerbating nickel contact dermatitis. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* doi:10.1111/j.1398-9995.1998.tb04986.x.
- Rannem, T., K. Ladefoged, E. Hylander, J. Hegnhøj, and M. Staun. 1998. Selenium depletion in patients with gastrointestinal diseases: Are there any predictive factors?. *Scand. J. Gastroenterol.* 33:1057–1061. doi:10.1080/003655298750026750.
- Seyrek, K., T. Karagenç, S. Paşa, F. Kiral, and A. Atasoy. 2009. Serum Zinc, Iron and Copper Concentrations in Dogs Infected with Hepatozoon canis. *Acta Vet. Brno* 78:471–475. doi:10.2754/avb200978030471.
- Soltanian, A., J. Khoshnegah, and M. Heidarpour. 2016. Comparison of serum trace elements and antioxidant levels in terrier dogs with or without behavior problems. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 180:87–92. doi:10.1016/J.APPLANIM.2016.04.012.
- Strecker, D., A. Mierzecki, and K. Radomska. 2013. Copper levels in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Agric. Environ. Med.* 20:312–316.
- Strickland, J.M., J.P. Buchweitz, R.C. Smedley, K.J. Olstad, R.S. Schultz, N.B. Oliver, and D.K. Langlois. 2018. Hepatic copper concentrations in 546 dogs (1982–2015). *J. Vet. Intern. Med.* 32:1943–1950. doi:10.1111/jvim.15308.

- Sturniolo, G.C., V. Di Leo, M. Barollo, W. Fries, E. Mazzon, A. Ferronato, and R. D'Incà. 2000. The many functions of zinc in inflammatory conditions of the gastrointestinal tract. Pages 33–39 in *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*.
- Suh, M., C.M. Thompson, G.P. Brorby, L. Mittal, and D.M. Proctor. 2016. Inhalation cancer risk assessment of cobalt metal. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 79:74–82. doi:10.1016/j.yrtph.2016.05.009.
- Suttle, N.F. 2010. *Mineral Nutrition of Livestock: Fourth Edition*. Four ed. CABI, Wallingford, UK.
- Tomza-Marciniak, A., B. Pilarczyk, M. Bąkowska, M. Ligocki, and M. Gaik. 2012. Lead, cadmium and other metals in serum of pet dogs from an urban area of NW Poland. *Biol. Trace Elem. Res.* 149:345–351. doi:10.1007/s12011-012-9433-6.
- Torres, F., M. Das Graças, M. Melo, and A. Tosti. 2009. Management of contact dermatitis due to nickel allergy: An update. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 2:39–48. doi:10.2147/ccid.s3693.
- Tuchinda, P., Y. Liu, A. Tammara, E. Harberts, R. Goldner, and A.A. Gaspari. 2014. Resolution of occupational dermatitis related to manganese exposures. *Dermatitis* 25:280–281. doi:10.1097/DER.0000000000000065.
- Vitale, S., D.W. Hague, K. Foss, M.C. de Godoy, and L.E. Selmic. 2019. Comparison of Serum Trace Nutrient Concentrations in Epileptics Compared to Healthy Dogs. *Front. Vet. Sci.* 6:1–8. doi:10.3389/fvets.2019.00467.
- Wada, O. 2004. What are Trace Elements?. *J. Japan Med. Assoc.* 47:607–612.
- Ward, R.J., F.A. Zucca, J.H. Duyn, R.R. Crichton, and L. Zecca. 2014. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 13:1045–1060. doi:10.1016/S1474-4422(14)70117-6.
- Webster, C.R.L., S.A. Center, J.M. Cullen, D.G. Penninck, K.P. Richter, D.C. Twedt, and P.J. Watson. 2019. ACVIM consensus statement on the diagnosis and treatment of chronic hepatitis in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 33:1173–1200. doi:10.1111/jvim.15467.
- Wu, T., C.T. Sempos, J.L. Freudenheim, P. Muti, and E. Smit. 2004. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Ann. Epidemiol.* 14:195–201. doi:10.1016/S1047-2797(03)00119-4.
- Wu, X., P.A.J. Leegwater, and H. Fieten. 2016. Canine models for copper homeostasis disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 17. doi:10.3390/ijms17020196.
- Zaccaroni, A., A. Corteggio, G. Altamura, M. Silvi, R. Di Vaia, C. Formigaro, and G. Borzacchiello. 2014. Elements levels in dogs from “triangle of death” and different areas of Campania region (Italy). *Chemosphere* 108:62–69. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.03.041.
- Zowczak, M., M. Iskra, L. Torliński, and S. Cofta. 2001. Analysis of serum copper zinc concentrations in cancer patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 82:1–8. doi:10.1385/BTER:82:1-3:001.



Capítulo 2

Niveles de oligoelementos en suero: una valiosa herramienta de diagnóstico en perros

Adaptado de:

Yolanda Cedeño, Marta Miranda, Inmaculada Orjales, Carlos Herrero-Latorre, Maruska Suárez, Diego Luna, Marta López-Alonso. Trace element levels in serum: a valuable diagnosis tool in dogs. *Animals*. *Enviado para publicación*

RESUMEN

Hay grandes evidencias en la literatura científica de que en el hombre ocurre un desequilibrio en la concentración de ciertos oligoelementos a nivel sanguíneo en numerosas enfermedades críticas, y que el estado de deficiencia mineral está relacionado con una mayor morbilidad y mortalidad. Sin embargo, la información de la que se dispone en animales, particularmente en mascotas, es muy escasa. El objetivo de este estudio es proporcionar evidencias del papel de los desequilibrios de elementos traza en la patogénesis de ciertas enfermedades en perros, así como evaluar la idoneidad de los oligoelementos como herramientas adicionales en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Para ello se analizaron, utilizando técnicas quimiométricas, los datos de las concentraciones séricas de oligoelementos (Cu, Mo, Se y Zn) de una muestra de perros control-sanos (n = 42) y afectados por enfermedad hepática (n = 25), gastrointestinal (n = 24), inflamatoria/infecciosa (n = 24) y renal (n = 22) junto con parámetros básicos de bioquímica (alanino aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina (CREA), albúmina (ALB), globulina (GLOB) y glucosa (GLU)). Nuestros resultados indican claramente que los oligoelementos tienen un papel importante durante la enfermedad, particularmente en relación a las reacciones de fase aguda: el cobre en suero como medida indirecta de ceruloplasmina (proteína de fase aguda positiva) y el selenio y el zinc como reactivos de fase aguda negativos. El molibdeno también podría ser un marcador adecuado de enfermedad renal incipiente. Teniendo en cuenta que hoy en día la determinación de las concentraciones de oligoelementos (mediante el uso de espectrometría de masa con fuente de plasma acoplado -ICP-MS) es una técnica multielemento sencilla, económica y disponible en numerosos laboratorios de diagnóstico, la determinación del perfil de oligoelementos en suero puede considerarse una herramienta adicional interesante para el diagnóstico de ciertas enfermedades, y particularmente a la hora de establecer el pronóstico basado en el riesgo asociado a la deficiencia de oligoelementos.

Palabras clave: perro, oligoelementos, perfil bioquímico, sangre, ICP-MS

1. Introducción

Los oligoelementos son micronutrientes esenciales que juegan un papel vital en muchos procesos fisiológicos y bioquímicos, puesto que actúan como cofactores de múltiples enzimas clave involucradas en la defensa antioxidante, la respuesta inmune, la cicatrización de heridas y la regulación de la expresión génica, entre otras funciones (Prashanth et al., 2015). A pesar de que las necesidades fisiológicas de elementos traza están bien definidas, tanto en humanos (WHO, 1996) como en animales domésticos (incluyendo ganado y mascotas; Mertz, 2012; AAFCO, 2014) y la suplementación mineral en alimentos ha demostrado ser una herramienta eficaz y segura para la prevención de las enfermedades específicas causadas por minerales (Tulchinsky, 2010), las deficiencias de minerales son todavía muy frecuentes en todo el mundo.

Las deficiencias de elementos traza están mejor estudiadas en humanos que en animales. La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2000) considera que más de 2 billones de personas en todo el mundo padecen deficiencias de vitaminas y minerales, particularmente en países en desarrollo, pero también en países desarrollados, afectando a personas de todos los géneros y edades, y en especial a ciertos grupos de riesgo. En la mayoría de los casos las deficiencias de elementos traza son epidemias silenciosas que no causan enfermedades específicas, sino que actúan como factores agravantes en enfermedades infecciosas y crónicas (Tulchinsky, 2010). En los últimos años, un gran número de publicaciones científicas han puesto de manifiesto deficiencias y desequilibrios de oligoelementos en numerosas patologías clínicas, particularmente en enfermos críticos, incluyendo trastornos cardíacos, insuficiencias hepáticas y renales, procesos oncológicos, inflamatorios o infecciosos, entre otros (Diana et al., 2017; MacDonell et al., 2018; Mcmillan, 2018; Ruocco et al., 2018; Almeida et al., 2020; Braunstein et al., 2020; Chasapis et al., 2020; Zemrani and Bines, 2020). En pacientes críticos, el estrés oxidativo está involucrado en el desarrollo de daño tisular secundario y fallo orgánico, y los oligoelementos que contribuyen a la defensa antioxidante, principalmente selenio (Se) y zinc (Zn) muestran niveles bajos en suero durante enfermedades críticas (Zemrani and Bines, 2020). Por otra parte, la magnitud de la respuesta inflamatoria después de la inflamación sistémica está inversamente correlacionada con los niveles plasmáticos de la mayoría de los micronutrientes (Mcmillan, 2018) de manera que se podría esperar que cuanto menor sea el nivel de micronutrientes, mayor será la probabilidad de daño a los órganos y mortalidad. Sin embargo, hay todavía muchas lagunas en el conocimiento de estos procesos y no está claro si el cambio en los niveles de oligoelementos en plasma durante la enfermedad crítica refleja simplemente la respuesta de fase aguda (cambios celulares), una deficiencia (alteraciones de la absorción o de admisión), una reducción de la disponibilidad o un aumento del metabolismo basal (Zemrani and Bines, 2020).

Aunque la información en medicina veterinaria es mucho más escasa, también hay evidencias de que algunos trastornos patológicos pueden estar asociados a desequilibrios minerales en sangre. Por ejemplo, se han descrito deficiencias de Se y Zn en perros que padecen diarrea independientemente de su etiología (Panda et al., 2009); los bajos niveles de Se en sangre se han asociado a una mayor incidencia de neoplasias y alergias (Pilarczyk et al., 2013); aumento de las concentraciones de Cu y disminución de las concentraciones de Fe y Zn en el suero de perros infectados con *Hepatozoon canis* (Seyrek et al., 2009) y con *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) (Da Silva et al., 2012); o aumento de las concentraciones de manganeso (Mn) en sangre total en perros con hepatitis primaria (Kilpatrick et al., 2014) o epilepsia (Vitale et al., 2019).

Los resultados del capítulo 1 de esta Tesis Doctoral muestran variaciones significativas en suero en los principales oligoelementos (Cu, Se, Zn y molibdeno (Mo)) en individuos que sufren diferentes patologías en comparación con el grupo control de animales sanos (Cedeño et al., 2020). Aunque preliminares, estos resultados sugieren que la determinación de oligoelementos en suero podría proporcionar información útil sobre la patogénesis de ciertas enfermedades. La investigación adicional de las concentraciones de elementos traza en el suero, junto con otros marcadores bioquímicos (por ejemplo, marcadores rutinarios de la función hepática y renal o de inflamación) pueden proporcionar información valiosa con respecto a la patogénesis de la enfermedad (por ejemplo, la identificación de síntomas derivados del daño oxidativo o alteraciones relacionadas con el desequilibrio mineral), el pronóstico de la enfermedad (prevención de complicaciones), así como para evaluar la conveniencia de utilizar la suplementación de elementos traza como terapia complementaria. En este estudio, los datos bioquímicos disponibles de esta muestra de perros, recogidos al mismo tiempo en que se realizó el análisis de suero de elementos traza, se analizaron junto con las concentraciones de elementos traza mediante análisis quimiométrico. Nuestro objetivo es investigar el papel de los elementos traza en la patogenia de estas enfermedades, así como evaluar la idoneidad de los elementos traza como herramientas adicionales en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

2. Material y métodos

2.1. Animales y recolección de muestras

En este estudio se utilizó la información química y bioquímica de 137 perros atendidos entre noviembre de 2015 y abril de 2017 en el Hospital Veterinario Rof-Codina, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela. La recogida de datos se realizó de acuerdo con la Directiva 2010/63 / UE sobre la protección de los animales utilizados con fines científicos (Parliament, 2010) y el ensayo cumplió con la legislación

española sobre cuidado animal (RD 53/2013, 1 de febrero de 2013)(BOE, 2013). Los procedimientos aplicados fueron supervisados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela (España).

La información detallada de la recogida de muestra y de los datos de los animales de estudio se describen en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral y en un trabajo previo (Cedeño et al., 2020). En el presente trabajo, de la muestra inicial de 187 perros utilizados en el estudio anterior se seleccionaron 137 individuos de los que también se disponía de datos analíticos bioquímicos básicos. Los perros se clasificaron según sus patologías en cinco grupos: control (n= 42; perros sanos que acuden al hospital para procedimientos de castración), hepático (n= 25), inflamatorio-infeccioso (n= 24), gastrointestinal (n= 24) y renal (n= 22). Los 50 individuos restantes con otras patologías incluidas en el estudio citado anteriormente (cardiorrespiratorio, dermatológico, neurológico y oncológico) no se consideraron en el presente estudio debido al bajo número de muestras en cada grupo, así como a la ausencia de un análisis bioquímico completo en un número importante de casos.

2.2. Preparación de muestras y análisis bioquímico y por ICP-MS

Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena cefálica y centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos. Se realizaron los análisis bioquímicos en un tiempo máximo de 1-2 horas tras la extracción, mientras que para el análisis de oligoelementos por ICP-MS se almacenaron las muestras a -20°C para el posterior análisis del conjunto total de muestras.

Se analizaron los siguientes parámetros bioquímicos en plasma: alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina (CREA), albúmina (ALB), globulina (GLOB) y glucosa (GLU). Los análisis se realizaron en el laboratorio clínico del Hospital Veterinario Universitario Rof-Codina utilizando el analizador bioquímico Catalyst One (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME) que utiliza tecnología de bioquímica seca y validado para este tipo de análisis (Boes et al., 2018). Durante el análisis se siguieron las indicaciones de mantenimiento del fabricante que incluye actualizaciones del software, ciclo de limpieza y control de calidad analítico (Quality Control Material-, QCM; VetTrol control plus diluent, IDEXX Laboratories). Los datos obtenidos también se compararon con los intervalos de referencia de cada una de las variables (ver **Tabla 1**).

Para el análisis por ICP-MS las muestras de suero fueron procesadas mediante digestión ácida y se realizó la determinación de las concentraciones de los elementos esenciales (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se y Zn) y tóxicos (As, Cd, Hg, Pb) en el sobrenadante, mediante ICP-MS en un equipo Agilent 7700x ICP-MS system (Agilent Technologies, Tokyo, Japan). Los detalles del muestreo, la preparación y análisis se desarrollan en detalle en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral y en un trabajo previo (Cedeño et al., 2020).

Tabla 1. Intervalos de referencia para variables bioquímicas.

Variable	Intervalo de referencia	Método química seca
ALT	10-125 U/L	LDH (sin P5P)
ALKP	23-212 U/L	pNNP+AMP+Mg
BUN	7-27 mg/dL	Ureasa
CREA	0.5-1.8 mg/dL	Enzimático colorimétrico
ALB	2.2-3.9 g/dL	Bromocresol verde
GLOB	2.5-4.5 g/dL	Cálculo
GLU	70-143 mg/dL	Glucosa oxidasa, POD

LDH: lactato deshidrogenasa; P5P: fosfato 5 piridoxina; pNNP: *p*-nitro-fenilfosfato; AMP: 2-amino-2-metil-1-propanol; POD: peroxidasa

2.3. Análisis de datos

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete quimiométrico y estadístico Statgraphics Centurion XVIII, ver. 18.1.12 (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA). La distribución normal de los datos fue comprobada mediante el test Kolmogorov-Smirnov (K-S) y cuando los datos no presentaron una distribución normal fueron transformados logarítmicamente. La influencia de la patología en la concentración de los elementos traza fue evaluada mediante ANOVA de una vía y pruebas *post-hoc*. Los datos también se compararon con el rango de referencia en animales sanos. Todos los análisis fueron considerados significativos con un valor $P < 0.05$.

Para llevar a cabo los procedimientos quimiométricos, los datos disponibles fueron la concentración de 12 metales (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn, As, Hg y Pb) determinados por ICP-MS en el suero de los 137 perros seleccionados de los cinco grupos descritos anteriormente, así como las 7 variables bioquímicas (ALT, ALKP, BUN, CREA ALB, GLOB, GLU). Sin embargo, tras unos ensayos preliminares, y considerando asimismo los resultados del capítulo 1 de esta Tesis Doctoral en el que sólo el Cu, Mo, Se y Zn demostraron ser elementos útiles como marcadores potenciales para las diferentes patologías, se decidió incluir solo los datos de esos elementos en el análisis. Se construyó una matriz de datos $X_{137 \times 11}$ en la que las filas eran los 137 perros seleccionados de los cinco grupos descritos anteriormente, y las columnas eran los valores de estos 4 metales considerados como marcadores interesantes más las 7 variables bioquímicas medidas.

Se han aplicado dos técnicas quimiométricas de visualización multidimensional no supervisadas para el estudio de las relaciones latentes en la matriz de datos $X_{137 \times 11}$. En

primer lugar, el Análisis de Clúster (AC) que es un procedimiento quimiométrico de visualización multidimensional que agrupa las muestras o las variables en grupos según su similitud evaluada en términos de distancia entre ellos. En este caso, para la estimación de la similitud entre muestras o variables se utilizó la distancia euclidiana al cuadrado como medida de similitud y se utilizó el método Ward (un procedimiento de aglomeración jerárquica) para realizar agrupaciones (Massart and Kaufman, 1983). Los conglomerados finales obtenidos en esta técnica pueden verse como una presentación gráfica de la muestra o conglomerados variables en forma de dendrograma, un diagrama de árbol empleado para mostrar la disposición de conglomerados producida por el AC. La segunda técnica aplicada, el análisis de componentes principales (ACP), también es una técnica de quimiometría de visualización, comúnmente utilizada complementariamente con AC, que permite un examen del conjunto de datos en una dimensión reducida conservando la mayor cantidad de información posible (Jolliffe, 1986). La técnica ACP transforma la matriz de datos original $X_{137 \times 11}$ en un producto de dos matrices, una de las cuales contiene información relacionada con las variables (matriz de puntaje) y la otra contiene información relacionada con las variables de carga (matriz de carga). Cuando el número de componentes principales (CP) seleccionados para la visualización del conjunto de datos es menor que el número de variables originales ($n = 11$), el ACP proporciona una importante simplificación de la matriz de datos original X .

Con el fin de evitar la influencia potencial del diferente tamaño de las variables originales, previamente a la aplicación de ambas técnicas quimiométricas AC y ACP sin supervisión, el conjunto de datos original se sometió a una autoescala. El procedimiento de autoescalado es un procedimiento de pretratamiento en el que cada valor se resta de la media de la variable y se divide por la desviación estándar de la variable. El resultado final es un nuevo conjunto de variables que contiene exactamente la misma información que las originales, pero con un tamaño similar, todas ellas con media cero y varianza unitaria (Massart, 1988).

3. Resultados

3.1. *Parámetros bioquímicos*

Los resultados de los parámetros bioquímicos básicos evaluados en los perros de este estudio se presentan en la **Figura 1** como gráficos de caja de bigotes para cada variable y grupo bioquímico (control, hepático, gastrointestinal, inflamatorio/infeccioso y renal).

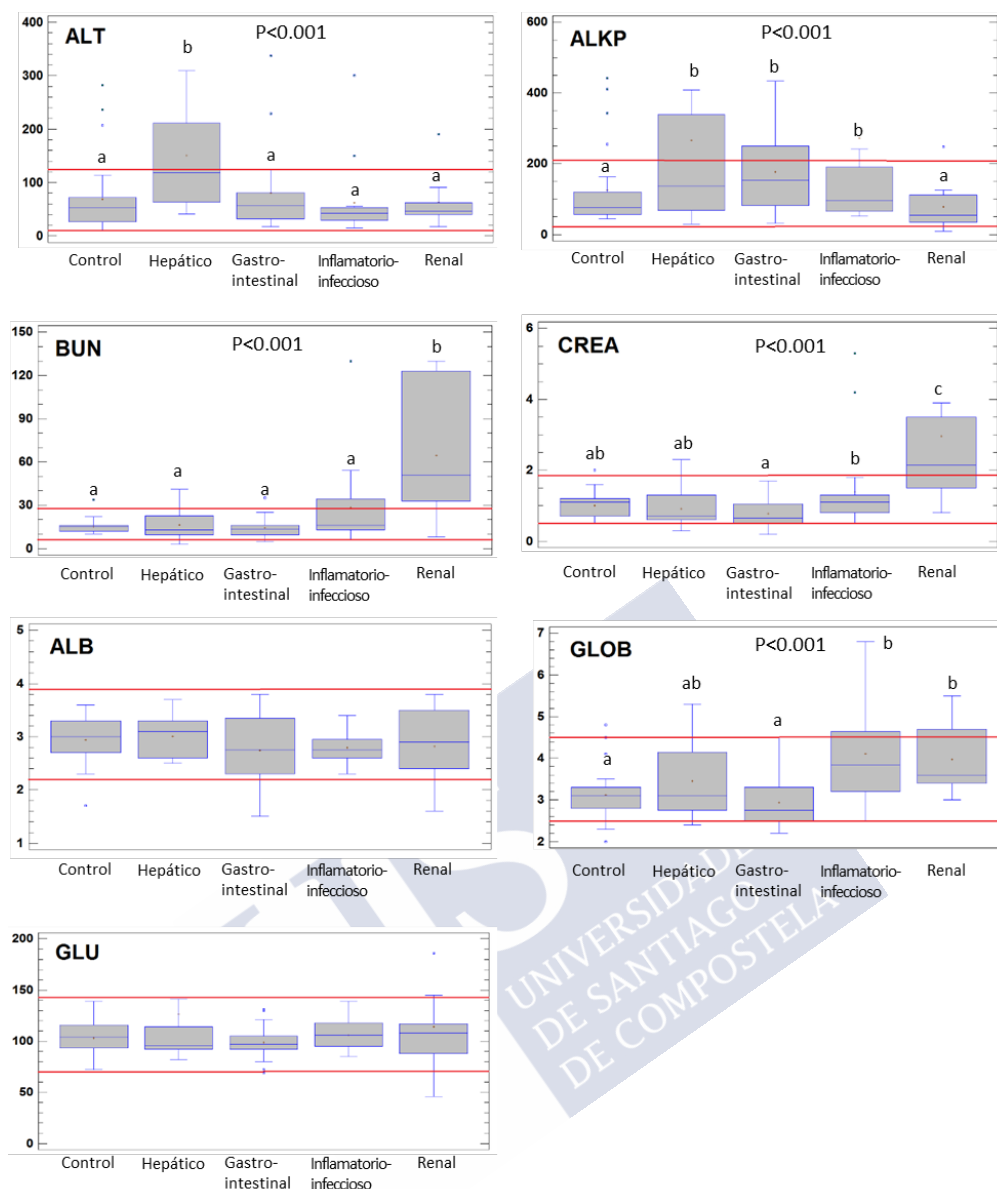


Figura 1. Gráfico de caja y bigotes que muestra las concentraciones de alanina aminotransferasa (ALT) (U/L), fosfatasa alcalina (ALKP) (U/L), nitrógeno ureico en sangre (BUN) (mg/dL), creatinina (CREA) (mg/dL), albúmina (ALB) (g/dL), globulina (GLOB) (g/dL), y glucosa (GLU) (mg/dL) en el suero de perros control sanos y perros con enfermedad hepática, gastrointestinal, inflamatorio/infecciosa y renal.

Las líneas rojas representan el límite de referencia inferior y el límite de referencia superior del intervalo de referencia para cada variable. La línea azul horizontal dentro del cuadro simboliza la mediana de la variable; la cruz roja es el valor medio; y los límites inferior y superior de la caja representan el primer y tercer cuartiles (por lo tanto, la caja es el intervalo que cubre el 50% del medio de los valores); los bigotes se dibujan desde los bordes del cuadro hasta los valores más altos y más bajos (excepto los valores inusualmente muy alejados del cuadro). En este caso, los valores atípicos, es decir, aquellos puntos más de 1.5 veces el rango intercuartil (ancho de la caja) encima o debajo de la caja, se indican mediante cuadrados azules. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

En general, todos estos parámetros bioquímicos están dentro de los intervalos de referencia para la especie (marcados con líneas rojas) en los animales que pertenecen al grupo control. Como se esperaba, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los perros que padecen diferentes trastornos. La ALT fue significativamente mayor en perros que sufren trastornos hepáticos, donde más del 57% de los perros están por encima del rango normal superior. La ALKP fue significativamente superior en los grupos de alteración hepática, gastrointestinal e inflamatoria en comparación con el control; 43 y 33 % de perros tienen valores de ALKP por encima del rango normal dentro de los grupos hepático y gastrointestinal. El BUN y la CREA fueron significativamente mayores en el grupo renal, donde el 86 y 54 % de los animales mostraron valores de BUN y CREA, respectivamente por encima del rango normal. Las concentraciones de GLOB fueron significativamente más altas en los perros que padecían enfermedades hepáticas, inflamatorias y renales; en las dos últimas categorías, un 37 y 30 %, respectivamente tienen concentraciones GLOB superiores al rango fisiológico normal. Finalmente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo control y los perros afectados para ALB y GLU.

3.2. Análisis quimométrico que muestra la relación entre oligoelementos y parámetros bioquímicos

Para establecer las relaciones entre las variables consideradas, se aplicó la técnica AC en la matriz de datos $X_{137 \times 11}$ para los diferentes grupos: control, hepático, gastrointestinal, inflamatorio/infeccioso y renal. En todos los casos, la similitud entre las variables se calcula a partir del cuadrado de distancia euclidiana entre ellos siguiendo el método de Ward. Se observaron patrones diferentes e interesantes para los diferentes grupos. Cuando se aplicó la técnica AC a los perros control, el dendrograma resultante (ver **Figura 2**) presentó dos grupos principales y bien separados. Por un lado, todos los parámetros indicativos de una función hepática adecuada en perros sanos están estrechamente asociados, y dentro de ellos encontramos 3 subgrupos bien definidos: ALKP y ALT (indicativo de daño hepático y colestasis; en este caso ausencia de patología) ALB y GLU (indicativo de metabolismo adecuado cuando está por encima del rango inferior) y BUN y GLOB (dentro de los valores normales indicativos de ausencia de enfermedad). Por otro lado, todos los elementos traza (Cu, Mo, Se y Zn) estaban estrechamente asociados y a una distancia relativamente corta de CREA (un parámetro que en individuos sanos normales es solo una indicación del metabolismo muscular).

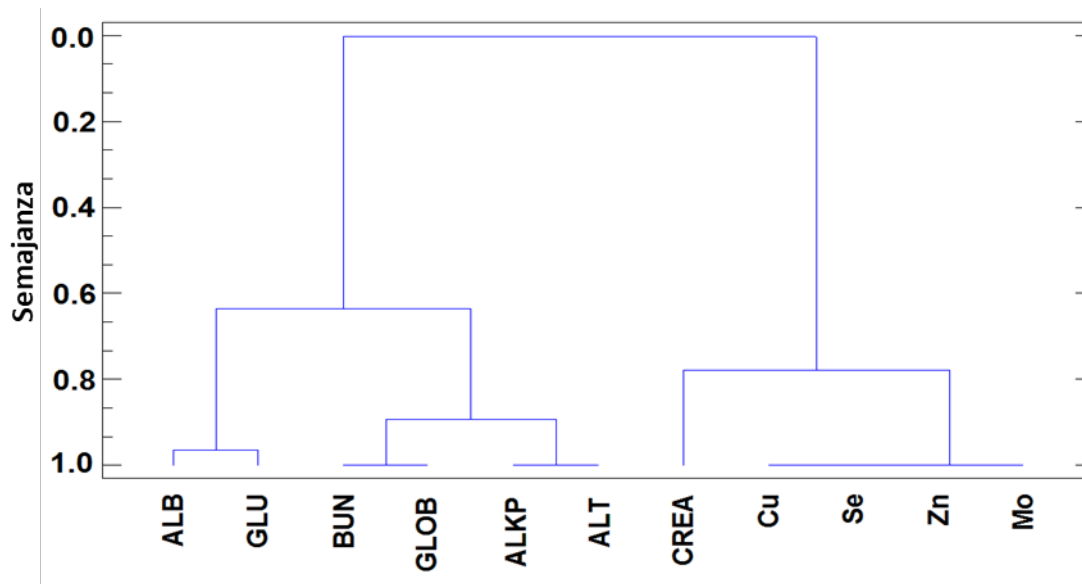


Figura 2. Dendrograma obtenido por análisis de clúster (CA) (basado en distancia Euclidiana al cuadrado y método Ward) de los animales sanos o grupo control.

En la **Figura 3** se muestran los resultados obtenidos cuando se aplicó el mismo procedimiento de AC a los grupos de animales con patologías, mostrando patrones de asociación entre oligoelementos y parámetros bioquímicos completamente diferentes. Las relaciones más interesantes entre oligoelementos y variables bioquímicas son las siguientes:

- (i) El Cu está estrechamente relacionado con GLOB en los trastornos patológicos en los que estas proteínas están elevadas, es decir, hepático, inflamatorio/infeccioso y renal. Además, en los animales que padecen inflamación/infección, tanto el Cu como las GLOB están asociados con la GLU (lo que refleja un alto consumo de GLU de estos individuos) y en los pacientes renales con el Se (un elemento traza que tiene un mecanismo homeostático renal).
- (ii) El Mo está estrechamente relacionado con BUN y CREA en los pacientes afectados por trastornos renales y hepáticos. Esta asociación era esperable ya que Mo tiene un claro mecanismo de regulación homeostático renal y en ambos grupos puede ocurrir un compromiso del aclaramiento renal de BUN y CREA. Es notable también la estrecha asociación entre ALKP y ALT con el Mo en los pacientes con inflamación/infección.

(iii) Tanto el Se como el Zn están estrechamente asociados entre ellos y con la ALB (y en menor medida con la GLU) en todos los grupos, lo que posiblemente indica un papel de estos parámetros en las reacciones de fase aguda.

Y (iv) finalmente cabe señalar que nuestro análisis muestra claramente estrechas asociaciones entre los parámetros bioquímicos que indican daño hepático (ALKP y ALT), función renal (BUN y CREA), función hepática (ALB y GLU) e inflamación (GLOB).

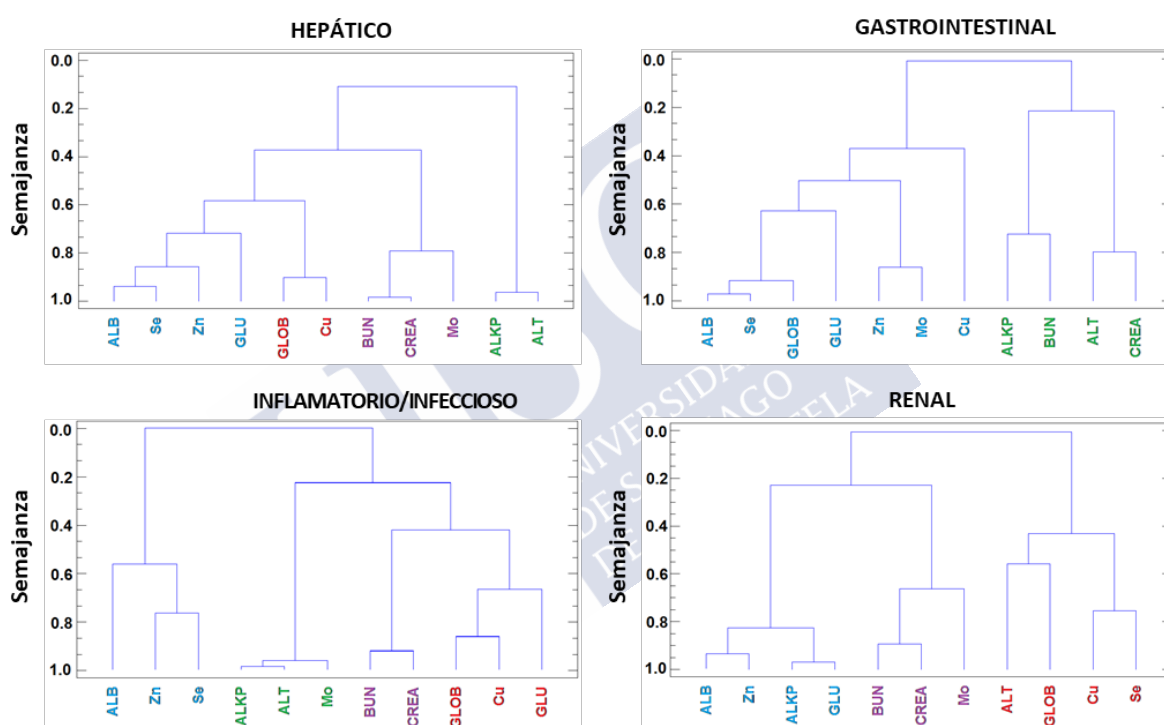


Figura 3. Dendrograma obtenido por análisis de clúster (CA) (basado en distancia Euclidiana al cuadrado y método Ward) para los diferentes grupos de perros enfermos afectados por enfermedad hepática, gastrointestinal, inflamatoria/infecciosa y renal.

Aunque la mayoría de estas asociaciones latentes entre las variables reveladas por la técnica AC son lógicas y están bien definidas, las relaciones entre las variables también se estudiaron mediante la aplicación de una segunda técnica quimiométrica de visualización como procedimiento de verificación. En este caso, la técnica ACP también se realizó en los cuatro grupos de animales que presentaban procesos patológicos. Los resultados de la

asociación entre los elementos traza y las variables bioquímicas se evaluaron a través de los gráficos de carga de las variables en el espacio definido por los primeros tres componentes principales (ver **Figura 4**), representando un 74.9%, 65.0%, 65.1% y 68.1% de la varianza total de los datos para los grupos de patología hepática, gastrointestinal, inflamatoria/infecciosa y renal, respectivamente. Como se puede ver, la técnica ACP reveló las mismas asociaciones entre las variables que las detectadas previamente por el AC. Para cada una de las enfermedades consideradas se observó el mismo patrón de asociación con ambas técnicas quimiométricas de visualización (ver asociaciones marcadas con los mismos códigos de color en las **Figuras 3 y 4**). Por lo tanto, el resultado concordante obtenido por dos técnicas quimiométricas diferentes con diversas bases matemáticas refuerza y confirma los resultados obtenidos.

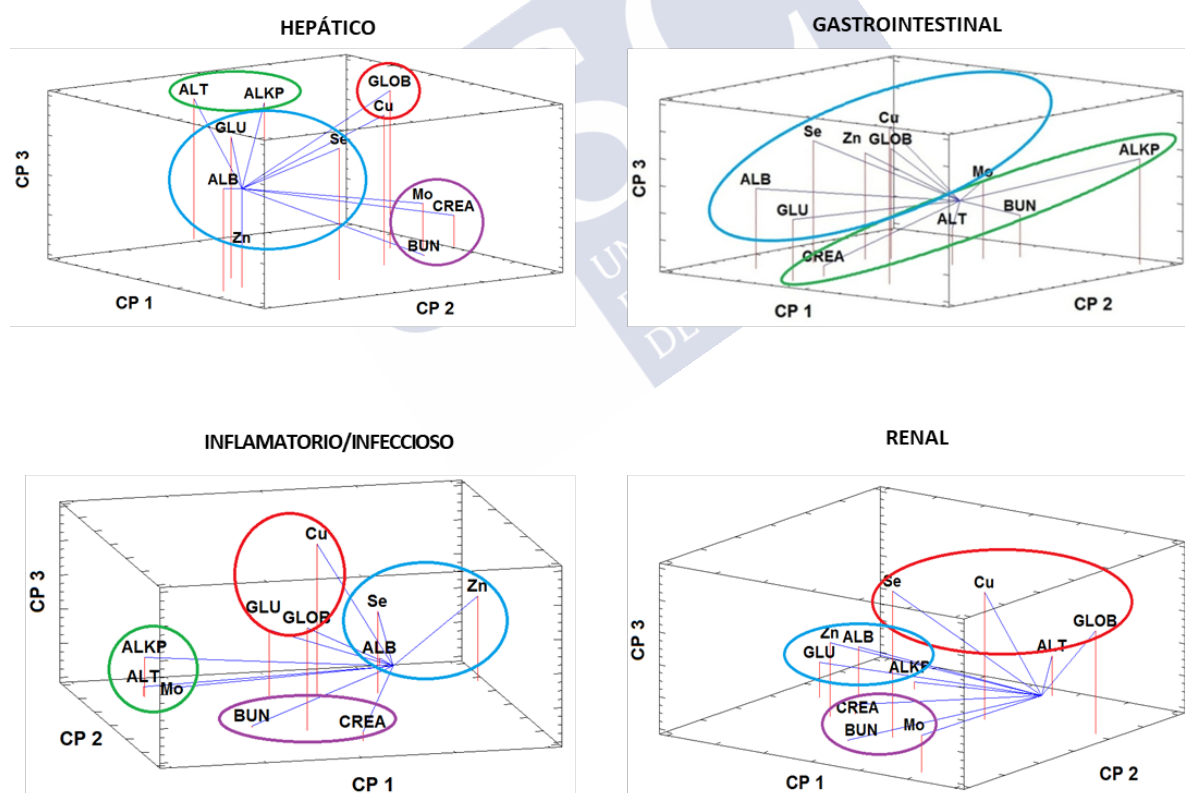


Figura 4. Gráfico de análisis de componentes principales (ACP) para los primeros tres componentes principales obtenidos de los diferentes grupos de perros patológicos afectados por enfermedad hepática, gastrointestinal, inflamatoria/infecciosa y renal representando un 74.9, 65.0, 65.1 y 68.1% de la varianza, respectivamente.

4. Discusión

Los resultados de nuestro estudio en una muestra de perros bastante heterogénea, que padecen una gran variedad de patologías en diferentes etapas, y en la que se esperaría un ruido experimental bastante alto, nos permite confirmar los resultados obtenidos en el capítulo 1 de la presente tesis doctoral (Cedeño et al., 2020) que indican un papel significativo de los oligoelementos en la patogénesis de ciertas enfermedades y nuestra hipótesis de que los oligoelementos junto con otros marcadores bioquímicos básicos de enfermedad podrían proporcionar información relevante sobre el diagnóstico y el pronóstico de ciertas enfermedades en perros.

Como se describió anteriormente, las concentraciones séricas de Cu fueron significativamente mayores en los perros que sufren enfermedades hepáticas e inflamatorias/infecciosas (Cedeño et al., 2020). Los resultados de este estudio demuestran que el Cu se asocia a la GLOB en ambos grupos de enfermedades, lo que sugiere una conexión con la ceruloplasmina. La ceruloplasmina es una glicoproteína alfa 2 que se considera una de las principales proteínas positivas de fase aguda en perros (Martínez-Subiela et al., 2003) que desempeña un papel importante en la protección de los tejidos del huésped contra los metabolitos tóxicos de oxígeno liberados por las células fagocíticas durante los estados inflamatorios (Halliwell and Gutteridge, 1990). Además, participa en el transporte de Cu y en la defensa antioxidante (Samokyszyn et al., 1989), este último al inhibir la formación de reactivos oxidantes estimulados por iones de Cu y los captadores peróxido y superóxido. Los niveles de ceruloplasmina en suero canino aumentan durante la infección, inflamación o trauma (Conner et al., 1988; Seyrek et al., 2009; Da Silva et al., 2012). El aumento es mayor y se evidencia antes que en los humanos, alcanzando un pico de aproximadamente el doble de los valores normales al cuarto día después de la cirugía (Conner et al., 1988). La medición de esta proteína proporciona información valiosa sobre el estado inflamatorio en la práctica clínica (Solter et al., 1991) y se ha demostrado que es útil para monitorizar el tratamiento de la leishmaniosis canina (Martínez-Subiela et al., 2003). Si el Cu en suero es un buen indicador de ceruloplasmina, podría tener un valor diagnóstico en este tipo de enfermedades inflamatorias. Además, de la estrecha asociación entre Cu y GLOB con GLU también parece apoyar el papel de Cu durante la inflamación. Es bien sabido que durante la infección hay un aumento en el consumo de glucosa (Ojcius et al., 1998); (Raghunand and Dale, 1999). La llamada "hiperglucemia por estrés" resulta de la liberación de hormonas contrarreguladoras (glucagón, cortisol, epinefrina) que se oponen a la acción de la insulina, que se liberan como parte de la respuesta fisiológica de "estrés" a la infección (Marik and Raghavan, 2004).

En nuestro estudio el Cu (junto con el Se) también aparece relacionado con GLOB en el grupo de pacientes renales. En perros la enfermedad renal crónica está asociada con un

estado de inflamación crónica (incluso en pacientes en situaciones estables) que se ha relacionado directamente con un aumento del riesgo de enfermedad periodontal y cardiovascular (Glickman et al., 2011). Dado que la UREA y la CREA en sangre solo detectan una disminución de >75% de la masa funcional renal, existe la necesidad de marcadores que permitan la detección temprana del daño renal y eviten el riesgo de complicaciones (Smets et al., 2010), y en este sentido, los cambios en las concentraciones de Cu en el suero (como se indicó anteriormente) podrían ofrecer información valiosa. También vale la pena señalar que las GLOB estaban relacionadas con la ALT en el grupo renal. Está bien documentado que en humanos los niveles séricos de ALT de pacientes con enfermedad renal crónica prediálisis tienden a disminuir en proporción a la progresión de su enfermedad renal crónica, siendo los niveles séricos de ALT aún más bajos en pacientes en hemodiálisis (Chimata et al., 1994; Fabrizi et al., 2001; Sette & Lopes, 2015; Abdallah et al., 2019). Algunos factores que podrían estar implicados en la reducción de los niveles séricos de AST en pacientes con enfermedad renal crónica en hemodiálisis pueden ser los niveles séricos de piridoxina más bajos, los niveles más altos de homocisteína y la hemodilución debida a la retención de líquidos (Huang et al., 2002).

En el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral observamos que las concentraciones séricas de Mo fueron significativamente mayores en animales que padecían trastornos renales (Cedeño et al., 2020). Estos resultados eran esperables ya que el Mo tiene un mecanismo de homeostasis renal (Johnson, 1997). En este estudio encontramos una estrecha asociación entre los niveles de Mo en suero y los marcadores de función renal BUN y CREA en el grupo renal. La información sobre las concentraciones de Mo en suero de pacientes renales es muy escasa. En un estudio reciente en perros y gatos con nefritis intersticial crónica se observó que la proporción de excreción de Mo en la orina era menor que en animales sanos (Alborough et al., 2020). En humanos, se ha sugerido que las altas concentraciones de Mo en suero podrían contribuir a la enfermedad ósea relacionada con la diálisis en pacientes que requieren hemodiálisis a largo plazo, ya que la acumulación masiva de Mo causa deformidad articular y artritis (Manuti et al., 2011). También merece la pena mencionar que los niveles de Mo estuvieron estrechamente relacionados con BUN y CREA en los pacientes hepáticos. Aunque BUN y CREA estuvieron dentro del rango adecuado en el grupo de pacientes con enfermedad hepática, la asociación con el Mo podría indicar una fase inicial en el compromiso de la función renal. La enfermedad hepática crónica se asocia con enfermedad renal primaria y secundaria e impacta notablemente en la supervivencia de los pacientes; en estos casos, la evaluación de la función renal y las lesiones asociadas se basa en la medición de la concentración de CREA sérica. En este sentido, debemos tener en cuenta que los niveles de BUN pueden disminuir en animales que padecen insuficiencia hepática (Stockham and Scott, 2002) y la CREA no es un marcador temprano de enfermedad renal (Parikh et al., 2005). En los pacientes con enfermedad hepática crónica

sería de gran utilidad disponer de biomarcadores tempranos de lesión renal, ya que el diagnóstico y la aplicación temprana de terapias beneficiosas parece ser crucial en la reducción potencial de la gravedad de la lesión renal y el aumento de las tasas de supervivencia (Slack et al., 2010). Nuestros resultados indican que el Mo cuando se relaciona con BUN y CREA (incluso dentro de los rangos de referencia) podría brindar información útil sobre cambios incipientes en el riñón y justifican una evaluación adicional. Es notable también la estrecha asociación entre ALT y ALKP con Mo en los pacientes con inflamación/infección que se muestran mediante las dos técnicas quimiométricas. Sin embargo, en lo que a nosotros respecta, no hay información disponible en la literatura científica que nos permita discutir las implicaciones de esta asociación.

Por último, pero no menos importante, encontramos una estrecha asociación entre Se y/o Zn con ALB. La ALB es una proteína somática/plasmática clave en importantes procesos fisiológicos, que es esencial en cualquier perfil bioquímico básico de salud. Los cambios cuantitativos en la concentración de ALB sérica representan un indicador importante de la presencia de enfermedad o su progresión o mejora. La importancia de las estimaciones de ALB sérica se limita a diversos grados de hipoalbuminemia, ya que, a excepción de los casos de deshidratación aguda, no se produce hiperalbuminemia. El nivel de ALB sérica depende del equilibrio entre la síntesis, el catabolismo (es decir, la degradación endógena y la pérdida externa) y la distribución entre el grupo intravascular y extravascular, cualquiera de los cuales puede ser alterado de forma individual o en combinación en la enfermedad. En medicina clínica, la hipoalbuminemia generalmente no es el resultado de un solo mecanismo. Las causas de hipoalbuminemia incluyen la desnutrición, la mala digestión y/o el síndrome de malabsorción, insuficiencia hepática, enteropatía perdedora de proteínas, síndrome nefrótico y, por último, pero no menos importante, inflamación e infección, donde la ALB se considera una proteína de fase aguda negativa. Las proteínas de fase aguda son una clase de proteínas cuyas concentraciones plasmáticas aumentan (proteínas positivas de fase aguda) o disminuyen (proteínas negativas de fase aguda) en respuesta a la inflamación y otros procesos fisiológicos agudos dentro de las reacciones de fase aguda (Gruys et al., 2005). En respuesta a una lesión, las células inflamatorias locales (neutrófilos granulocitos y macrófagos) secretan un número de citoquinas en el torrente sanguíneo, de las cuales las más notable son las interleucinas (IL-1 y IL6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). El papel fisiológico de la disminución de la síntesis de albúmina y otras proteínas de fase aguda negativas, como la selenoproteína P, es generalmente para ahorrar amino ácidos para la producción más eficiente de proteínas de fase aguda "positivas".

Junto con las proteínas de fase aguda negativas, se sabe que algunos elementos traza circulantes como el Se y Zn también disminuyen de forma significativa durante la reacción de fase aguda (Gruys et al., 2005). Renko y col. (2009) han demostrado que el metabolismo

del Se hepático se altera progresivamente durante la reacción de fase aguda que afecta negativamente el nivel del Se en suero debido a una biosíntesis insuficiente de la proteína central de transporte y almacenamiento selenoproteína P. Además, la hipoxia asociada a enfermedades graves también se ha asociado con una disminución general de la expresión de selenoproteína P (Becker et al., 2014) y, por lo tanto, una disminución de la exportación de Se de los hepatocitos. Por otro lado, la disminución de los niveles séricos de Zn observada durante las reacciones de fase aguda parece estar asociada a la disminución de la secreción hepatocítica de la albúmina, ya que es el principal transportador de Zn en el torrente sanguíneo. Sin embargo, también es posible que la regulación negativa por las citocinas proinflamatorias en el hígado sobre el transportador Zip-14 (Mohammad et al., 2012) y de la síntesis de metalotioneína (DiSilvestro and Carlson, 1992) que son moléculas clave en la capacidad de unión intracelular de iones metálicos, podrían causar una disminución de los valores de Zn en suero (Gruys et al., 2005). La disminución de las concentraciones de Se y Zn en estos pacientes es muy relevante ya que ambos elementos son cofactores de enzimas esenciales: el Se es esencial para la actividad catalítica de la enzima glutatión peroxidasa que protege contra la peroxidación lipídica de membrana, mientras que el Zn también combate el estrés oxidativo como cofactor en la superóxido dismutasa (Michiels et al., 1994). Con tales roles, el estatus adecuado de estos oligoelementos es de particular importancia en pacientes críticos. Algunos autores proponen que esta reducción puede agotar los antioxidantes circulantes y conducir a una elevación de especies reactivas de oxígeno (ROS) exacerbando la gravedad de la enfermedad (Becker et al., 2014; Rinaldi et al., 2009). Por esta razón, la monitorización de los niveles de Se y Zn en suero, junto con la ALB (proteína de fase aguda negativa) y la proteína C reactiva (proteína de fase aguda positiva) podría ofrecer una información valiosa al evaluar pacientes críticos.

5. Conclusiones

Los resultados de nuestro estudio, en una muestra de perros que cubre una gran variedad de trastornos patológicos, indica claramente que los oligoelementos en suero tienen un gran papel durante la enfermedad, particularmente en relación con las reacciones de fase aguda: el Cu como medida indirecta de ceruloplasmina (proteína de fase aguda positiva), el Se y Zn como reactivos de fase aguda negativa. El Mo también podría ser un marcador adecuado de enfermedad renal incipiente. Teniendo en cuenta que hoy en día la determinación de las concentraciones de elementos traza (mediante el uso de la técnica multielemento ICP-MS) es una técnica sencilla y relativamente económica, disponible en numerosos laboratorios de diagnóstico, la determinación del perfil de elementos traza en el suero podría permitir no sólo apoyar el diagnóstico llevado a cabo con otros marcadores

bioquímicos, sino también para hacer un mejor pronóstico del riesgo asociado a la deficiencia de los mismos (por ejemplo, Se y Zn podrían ser medidas indirectas del potencial antioxidante representado por la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa). Teniendo en cuenta que las deficiencias de elementos traza se asocian con un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad, deberían de llevarse a cabo nuevas investigaciones para estudiar los beneficios potenciales de la suplementación con oligoelementos antioxidantes en pacientes que sufren de una enfermedad grave.

Referencias

- AAFCO. 2014. AAFCO methods for substantiating nutritional adequacy of dog and cat food. AAFCO Dog Cat Food Nutr. Profiles 1–24.
- Abdallah, O.B., M.Y.G. Younis, J.A. Alammari, and F. Abdelmalek. 2019. Evaluation of hepatic enzymes in Libyan chronic kidney disease patients: need for lower standard "normal" range. *EPH-International J. Appl. Sci.* (ISSN 2208-2182) 1:751–761.
- Alborough, R., L. Grau-Roma, S. de Brot, G. Hantke, S. Vazquez, and D.S. Gardner. 2020. Renal accumulation of prooxidant mineral elements and CKD in domestic cats. *Sci. Rep.* 10:3160. doi:10.1038/s41598-020-59876-6.
- de Almeida, A.A., K. Gajewska, M.C.F. Duro, F. do A.F. da Costa, and E.A.C. Pinto. 2020. Trace element imbalances in patients undergoing chronic hemodialysis therapy—report of an observational study in a cohort of Portuguese patients. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 126580.
- Becker, N.-P., J. Martitz, K. Renko, M. Stoedter, S. Hybsier, T. Cramer, and L. Schomburg. 2014. Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis. *Metallomics* 6:1079–1086.
- BOE, 2013. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *BOE* 34:11370–11421.
- Boes, K.M., C.A. Sink, M.S. Camus, and S.R. Werre. 2018. Evaluation of an in-clinic dry chemistry analyzer for canine, equine, and feline plasma samples. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 30:902–910. doi:10.1177/1040638718809407.
- Braunstein, M., T. Kusmenkov, C. Zuck, M. Angstwurm, N.-P. Becker, W. Böcker, L. Schomburg, and V. Bogner-Flatz. 2020. Selenium and selenoprotein P deficiency correlates with complications and adverse outcome after major trauma. *Shock* 53:63.
- Cedeño, Y., M. Miranda, I. Orjales, C. Herrero-Latorre, M. Suárez, D. Luna, and M. López-Alonso. 2020. Serum Concentrations of Essential Trace and Toxic Elements in Healthy and Disease-Affected Dogs. *Animals* 10:1052. doi:10.3390/ani10061052.
- Chasapis, C.T., P.-S.A. Ntouna, C.A. Spiliopoulou, and M.E. Stefanidou. 2020. Recent aspects of the effects of zinc on human health. *Arch. Toxicol.* 1–18.
- Chimata, M., H. Masaoka, M. Fujimaki, N. Hamada, K. Oda, M. Sudo, and M. Nagase. 1994. Low serum aminotransferase activity in patients undergoing regular hemodialysis. *Japanese J. Nephrol.* 36:389–395.

- Conner, J.G., P.D. Eckersall, J. Ferguson, and T.A. Douglas. 1988. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Res. Vet. Sci.* 45:107–110.
- Diana, A., J.J. Haszard, D.M. Purnamasari, I. Nurulazmi, D.E. Luftimas, S. Rahmania, G.I. Nugraha, J. Erhardt, R.S. Gibson, and L. Houghton. 2017. Iron, zinc, vitamin A and selenium status in a cohort of Indonesian infants after adjusting for inflammation using several different approaches. *Br. J. Nutr.* 118:830–839.
- DiSilvestro, R.A., and G.P. Carlson. 1992. Inflammation, an inducer of metallothionein, inhibits carbon-tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol. Lett.* 60:175–181.
- Fabrizi, F., G. Lunghi, S. Finazzi, P. Colucci, A. Pagano, C. Ponticelli, and F. Locatelli. 2001. Decreased serum aminotransferase activity in patients with chronic renal failure: impact on the detection of viral hepatitis. *Am. J. kidney Dis.* 38:1009–1015.
- Glickman, L.T., N.W. Glickman, G.E. Moore, E.M. Lund, G.C. Lantz, and B.M. Pressler. 2011. Association between chronic azotemic kidney disease and the severity of periodontal disease in dogs. *Prev. Vet. Med.* 99:193–200. doi:10.1016/j.prevetmed.2011.01.011.
- Gruys, E., M.J.M. Toussaint, T.A. Niewold, and S.J. Koopmans. 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 6:1045.
- Halliwell, B., and J.M.C. Gutteridge. 1990. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Elsevier.
- Huang, J.-W., C.-J. Yen, M.-F. Pai, K.-D. Wu, T.-J. Tsai, and B.-S. Hsieh. 2002. Association between serum aspartate transaminase and homocysteine levels in hemodialysis patients. *Am. J. kidney Dis.* 40:1195–1201.
- Johnson, J.L. 1997. Molybdenum. R.A. O'Dell, B. L., & Sunde, ed. CRC Press.
- Jolliffe, I.T. 1986. Principal components in regression analysis. Springer Series in Statistics, New York, NY.
- Kilpatrick, S., A. Jacinto, R.D. Foale, S.W. Tappin, C. Burton, P.E. Frowde, C.M. Elwood, R. Powell, A. Duncan, and R.J. Mellanby. 2014. Whole blood manganese concentrations in dogs with primary hepatitis. *J. Small Anim. Pract.* 55:241–246.
- MacDonell, S.O., J.C. Miller, M.J. Harper, M.R. Reid, J.J. Haszard, R.S. Gibson, and L.A. Houghton. 2018. A comparison of methods for adjusting biomarkers of iron, zinc, and selenium status for the effect of inflammation in an older population: A case for interleukin 6. *Am. J. Clin. Nutr.* 107:932–940.
- Manuti, J.K., F.G. Al-Rubaye, and M.S. Khudhair. 2011. Serum Concentration of Molybdenum in Chronic Renal Failure Patients Requiring Hemodialysis. *J. Fac. Med. Baghdad* 53:393–395.
- Marik, P.E., and M. Raghavan. 2004. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care Med.* 30:748–756.
- Martínez-Subiela, S., L.J. Bernal, and J.J. Cerón. 2003. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *Am. J. Vet. Res.* 64:1021–1026.
- Massart, D.L. 1988. Chemometrics: a textbook. *Data Handl. Sci. Technol.* 2:53.
- Massart, D.L., and L. Kaufman. 1983. Hierarchical clustering methods. *Interpret. Anal. Chem. data by use Clust. Anal.* 75–99.
- Mcmillan, D.C. 2018. Relationship between nutritional status and the systemic inflammatory response: Micronutrients Conference on 'Nutrient – nutrient interaction' Symposium 2:

- Nutrient interactions and their role in protection from chronic diseases Relationship between n. doi:10.1017/S0029665118002501.
- Mertz, W. 2012. Trace Elements in Human and Animal Nutrition: Volume 2. Elsevier.
- Michiels, C., M. Raes, O. Toussaint, and J. Remacle. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 17:235–248.
- Mohammad, M.K., Z. Zhou, M. Cave, A. Barve, and C.J. McClain. 2012. Zinc and liver disease. *Nutr. Clin. Pract.* 27:8–20.
- Ojcius, D.M., H. Degani, J. Mispelter, and A. Dautry-Varsat. 1998. Enhancement of ATP levels and glucose metabolism during an infection by Chlamydia NMR studies of living cells. *J. Biol. Chem.* 273:7052–7058.
- Panda, D., R.C. Patra, S. Nandi, and D. Swarup. 2009. Oxidative stress indices in gastroenteritis in dogs with canine parvoviral infection. *Res. Vet. Sci.* 86:36–42. doi:10.1016/J.RVSC.2008.05.008.
- Parikh, C.R., E. Abraham, M. Ancukiewicz, and C.L. Edelstein. 2005. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16:3046–3052.
- Parliament, E. 2010. DIRECTIVE 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. B. Dir. 2010/63/EU Eur. Parliam. Counc. 22 Sept. 2010 Prot. Anim. used Sci. Purp. City 33–78.
- Pilarczyk, B., A. Tomza-Marciniak, R. Pilarczyk, M. Bakowska, M. Gaik, M. Wilk, and J. Kuba. 2013. Relationship between serum Se concentration in dogs and incidence of some disease conditions. *Cent. Eur. J. Biol.* 8:527–533. doi:10.2478/s11535-013-0163-8.
- Prashanth, L., K.K. Kattapagari, R.T. Chitturi, V.R.R. Baddam, and L.K. Prasad. 2015. A review on role of essential trace elements in health and disease. *J. dr. ntr Univ. Heal. Sci.* 4:75.
- Raghunand, N., and B.E. Dale. 1999. Alteration of glucose consumption kinetics with progression of baculovirus infection in *Spodoptera frugiperda* cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 80:231–242.
- Renko, K., P.J. Hofmann, M. Stoedter, B. Hollenbach, T. Behrends, J. Köhrle, U. Schweizer, and L. Schomburg. 2009. Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice. *FASEB J.* 23:1758–1765.
- Rinaldi, S., F. Landucci, and A.R. De Gaudio. 2009. Antioxidant therapy in critically septic patients. *Curr. Drug Targets* 10:872–880.
- Ruocco, M.A.C., E.D.P. Cechinatti, F. Barbosa Jr, and A.M. Navarro. 2018. Zinc and selenium status in critically ill patients according to severity stratification. *Nutrition* 45:85–89.
- Samokyszyn, V.M., D.M. Miller, D.W. Reif, and S.D. Aust. 1989. Inhibition of superoxide and ferritin-dependent lipid peroxidation by ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* 264:21–26.
- Sette, L.H.B.C., and E.P. de A. Lopes. 2015. The reduction of serum aminotransferase levels is proportional to the decline of the glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease. *Clinics* 70:346–349.

- Seyrek, K., T. Karagenç, S. Paşa, F. Kiral, and A. Atasoy. 2009. Serum Zinc, Iron and Copper Concentrations in Dogs Infected with *Hepatozoon canis*. *Acta Vet. Brno* 78:471–475. doi:10.2754/avb200978030471.
- Da Silva, A.S., R.T. França, M.M. Costa, C.B. V. Paim, F.C. Paim, C.M.M. Santos, E.M.M. Flores, T.L. Eilers, C.M. Mazzanti, S.G. Monteiro, C.H. do Amaral, and S.T.A. Lopes. 2012. Influence of *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) on Copper, Iron, and Zinc Bloodstream Levels in Experimentally Infected Dogs. *J. Parasitol.* 98:1018–1020. doi:10.1645/ge-2985.1.
- Slack, A., A. Yeoman, and J. Wendon. 2010. Renal dysfunction in chronic liver disease. *Crit. care* 14:214.
- Smets, P.M.Y., E. Meyer, B.E.J. Maddens, L. Duchateau, and S. Daminet. 2010. Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* 24:65–72.
- Solter, P.F., W.E. Hoffmann, L.L. Hungerford, J.P. Siegel, S.H. St Denis, and J.L. Dorner. 1991. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 52:1738.
- Stockham, S.L., and M.A. Scott. 2002. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Ames. Iowa State Univ. Press 52:434–459.
- Tulchinsky, T.H. 2010. Micronutrient deficiency conditions: global health issues. *Public Health Rev.* 32:243–255.
- Vitale, S., D.W. Hague, K. Foss, M.C. de Godoy, and L.E. Selmic. 2019. Comparison of Serum Trace Nutrient Concentrations in Epileptics Compared to Healthy Dogs. *Front. Vet. Sci.* 6:1–8. doi:10.3389/fvets.2019.00467.
- World Health Organization. 1996. *Trace Elements in Human Nutrition and Health*. World Health Organization.
- World Health Organization. 2000. *The World Health Report 2000: Health Systems: Improving Performance*. World Health Organization, Geneva.
- Zemrani, B., and J.E. Bines. 2020. Recent insights into trace element deficiencies: causes, recognition and correction. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 36:110–117.



Capítulo 3

Concentración de cobre y otros elementos esenciales y tóxicos en perros con hepatitis crónica

Adaptado de:

Cedeño Y, López-Alonso M, Miranda M. 2016. Hepatic concentrations of copper and other metals in dogs with and without chronic hepatitis. *Journal of Small Animal Practice*. 57(12): 703-709. DOI: 10.1111/jsap.12591

RESUMEN

Los defectos en el metabolismo del cobre han sido descritos en varias razas de perros, los cambios en otros elementos esenciales también podrían estar involucrados en la patogénesis de la enfermedad hepática. En este estudio se realizó la determinación de los niveles hepáticos de cobre y sus interacciones con otros elementos esenciales y tóxicos en perros diagnosticados con hepatitis crónica. Se tomaron 20 muestras de hígado de perros con hepatitis crónica y 20 muestras de animales sanos. Las muestras fueron procesadas por digestión ácida, y los elementos esenciales (cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, selenio y zinc) y tóxicos (arsénico, cadmio, mercurio y plomo) fueron determinados por espectroscopía de masas con fuente de plasma acoplado (ICP-MS). Las concentraciones de cobre fueron significativamente superiores en perros afectados por enfermedad hepática que en el grupo control. Los perros afectados con hepatitis crónica con concentraciones de cobre hepático mayor a 100 mg/kg peso húmedo mostraron niveles estadísticamente superiores de cobalto, manganeso y zinc que los animales con hepatitis crónica con concentraciones de cobre menores a 100 mg/kg peso húmedo y que los del grupo control. Las concentraciones de metales tóxicos fueron bajas en todos los casos e inferiores al umbral asociado a toxicidad en perros. Los perros con hepatitis crónica además de tener incrementados los niveles de cobre en hígado presentan también niveles superiores de cobalto, manganeso y zinc; la determinación de estos elementos podría contribuir en el diagnóstico de enfermedad hepática en perros.

Palabras clave: hepatitis crónica; cobre; perro; hígado; elementos traza

1. Introducción

El cobre (Cu) es un elemento esencial involucrado en varios procesos metabólicos, pero puede ser extremadamente tóxico cuando está en exceso. Esto se debe a que cuando las concentraciones exceden las necesidades fisiológicas, la capacidad del hígado de unir el Cu a metalotioneínas es sobrepasada y el Cu queda libre en el citosol causando importante daño oxidativo y muerte celular (Mercer, 2001).

Entre los animales domésticos la oveja es la especie más susceptible a la toxicidad por Cu debido a su baja capacidad de síntesis de metalotioneínas (Howell and Gooneratne, 1987); aunque se han descrito episodios de toxicidad por Cu en muchas otras especies, incluyendo el perro, donde la acumulación de Cu hepático está relacionada a numerosos episodios de hepatitis crónica: hepatitis crónica asociada a Cu (HCAC).

La HCAC fue identificada primero en el Bedlington Terrier como una alteración hereditaria autosómica recesiva, del gen *COMMD1*, la cual produce una disminución en la excreción biliar de Cu por un secuestro del metal en los lisosomas unido a metalotioneínas (van De Sluis et al., 2002). Durante la última década, se observó un incremento en el número de razas puras incluyendo al Doberman pinscher (Mandigers et al., 2004), West Highland white terrier (Thornburg et al., 1986), Skye terrier (Haywood et al., 1988), Dálmata (Webb et al., 2002) y más recientemente el Labrador retriever (Hoffmann et al., 2006; Smedley et al., 2009; Johnston et al., 2013). Aunque ocasionalmente, otras razas puras (Rifkin and Miller, 2014) y mixtas también han sido asociadas con HCAC (Watson, 2004). Para la mayoría de estas razas el mecanismo patológico involucrado no está bien determinado, pero la acumulación anormal puede ser resultado de un defecto primario en el metabolismo del Cu o secundario a un evento de alteración funcional hepática que afecta la excreción biliar de Cu (Kilpatrick et al., 2014). Cuando la acumulación de Cu es debida a un defecto primario, este se localiza en la región centrolobular (zona 3), en procesos secundarios el Cu se deposita en el parénquima periportal (zona 1) (Watson, 2004; Hoffmann et al., 2006; Johnston et al., 2013; Kilpatrick et al., 2014).

Se ha sugerido que los cambios en otros minerales esenciales pueden estar involucrados en la patogénesis de enfermedad hepática (Webb and Twedt, 2008), además del Cu, muchos animales afectados de HCAC tienen niveles incrementados de hierro (Fe) (Smedley et al., 2009), zinc (Zn) (Schultheiss et al., 2002; Pressler et al., 2010), aunque también se ha observado deficiencia concurrente de Zn hepático en otros (Rothuizen and Twedt, 2009). Recientemente se han reportado niveles de manganeso (Mn) y cobalto (Co) anormalmente altos en sangre en perros con hepatitis primaria (Pressler et al., 2010), lo cual puede tener un rol relevante en el desarrollo de encefalopatía hepática en estos animales (Kilpatrick et al., 2014). Por otra parte, la similitud química entre el Cu y otros metales tóxicos para inducir y unirse a metalotioneínas, como ocurre con animales expuestos de forma natural por el propio ambiente (Lopez-Alonso et al., 2002) pueden también contribuir a la patogénesis de la enfermedad.

Este estudio se llevó a cabo para evaluar la acumulación de Cu en hígado y su interacciones con otros elementos esenciales; Co, Fe, Mn, molibdeno (Mo), selenio (Se) y Zn, y tóxicos, arsénico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb); en perros afectados con hepatitis crónica y perros sanos.

2. Material y métodos

2.1. Animales de estudio

Se recogieron muestras de hígado de 20 perros afectados de hepatitis crónica (HC) durante el examen post-mortem. Las muestras fueron incluidas en el estudio después de confirmación histopatológica de acuerdo a los criterios de la World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) (Rothuizen et al., 2006). De estos perros, 8 murieron o fueron eutanasiados en estado avanzados de HC; 7 fueron diagnosticados de HC en base a resultados de laboratorio y de imagen, pero murieron o fueron eutanasiados por otras razones, y en los 5 animales restantes, la HC fue un hallazgo post-mortem. Además, se recogieron 20 muestras de hígados sanos (grupo control: C), confirmado por histopatología, de animales sin alteraciones metabólicas para usarlas como controles. El número de perros por grupo, fue seleccionado teniendo en cuenta la variabilidad de las concentraciones hepáticas de elementos traza y la disponibilidad de los casos. Las causas de muerte o eutanasia en los perros del grupo control fueron traumatismos de diferente índole, neoplasias localizadas, exposición a rodenticidas, etc. Los datos de edad, sexo, raza y otros relacionados al registro de salud fueron tomados de la historia clínica.

El grupo de perros con HC (n=20) estaba compuesto por perros de las razas Doberman pinscher (3), pastor alemán (3), Cocker spaniel inglés (2), Bóxer (1), Bull terrier (1), Husky siberiano (1), caniche (1) y cruces (8). Doce eran hembras y 8 machos, con un promedio de edad de 88 meses, rango de 6 a 214 meses. El grupo control (C) estuvo compuesto por perros de las razas pastor alemán (4), Bóxer (2), Bullmastiff (2), Pekinés (2), pastor belga (1), Cocker spaniel inglés (1), Husky siberiano (1), Bloodhound (1), Yorkshire terrier (1) y cruces (5). Doce eran hembras y 8 machos con un promedio de edad de 113 meses, rango de 26 a 201 meses.

2.2. Recogida de muestras y análisis químicos

Se tomaron 3 muestras profundas de 2cm x 2cm x 2cm del lóbulo lateral izquierdo del hígado, a fin de simular la toma de muestra por biopsia ecoguiada (Rothuizen et al., 2006). Todas las muestras fueron tomadas cerca al centro del lóbulo, evitando lesiones en el parénquima. Una de las muestras fue fijada en formol tamponado al 10% a temperatura ambiente para estudio histopatológico. Todas las muestras tuvieron un mínimo de 8 triadas portales. Las muestras restantes se envasaron en bolsas de plástico e inmediatamente se congelaron a -20 °C para el análisis mineral.

De estas últimas, se tomaron submuestras de 1 g. que fueron digeridas en 3 mL de ácido nítrico concentrado (Suprapur grade, Merck) y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 30% w/v en un sistema de digestión por microondas (Ethos Plus; Milestone, Sorisole, Italia). Las

muestras digeridas se transfirieron a tubos a de polipropileno y se diluyeron a un volumen final de 15 mL con agua mili-Q.

Se realizó la determinación de las concentraciones de elementos esenciales (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se y Zn) y tóxicos (As, Cd, Hg y Pb) mediante Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma Acoplado (ICP-MS, VG Elemental PlasmaQuad SOption). Durante todo el experimento se llevó a cabo un programa de control de calidad analítica. Los valores del blanco se restaron de cada muestra antes de que se realizara el cálculo de resultados. Los límites de detección (LoD), fueron calculados como tres veces la desviación estándar de los blancos (**Tabla 1**). Todas las muestras estuvieron por encima del límite de detección. Las recuperaciones analíticas fueron determinadas con un material de referencia certificado (Standard Reference Material® 1577c Bovine Liver; National Institute of Standards & Technology) analizado junto con las muestras. Se obtuvo una buena correlación entre los valores medidos y los valores certificados (**Tabla 1**).

Tabla 1. Programa de calidad analítica (expresado como media \pm DS) usado en la determinación de elementos traza esenciales y tóxicos

	Límite de detección ($\mu\text{g/L}$)	SRM 1577c	
		Niveles Certificados (mg/kg)	Niveles analizados (mg/kg)
As	0.3	0.0196 \pm 0.0014	0.0201 \pm 0.0007
Cd	0.1	0.0970 \pm 0.0014	0.1059 \pm 0.0038
Co	0.2	0.300 \pm 0.018	0.318 \pm 0.006
Cu	3.1	275.2 \pm 4.6	273.1 \pm 11.1
Fe	12	197.94 \pm 0.65	198.02 \pm 4.58
Hg	0.2	---	0.141 \pm 0.012
Mn	1.2	10.46 \pm 0.47	10.48 \pm 0.12
Mo	1.2	3.30 \pm 0.13	3.33 \pm 0.31
Pb	0.9	0.0628 \pm 0.0001	0.0599 \pm 0.0041
Se	1.2	2.031 \pm 0.045	1.989 \pm 0.047
Zn	15	181.1 \pm 1.0	180.4 \pm 1.7

La precisión del método analítico fue evaluada midiendo las señales de absorbancia de una misma muestra 12 veces. Para evaluar la precisión de todo el procedimiento se realizaron lecturas de 12 digestiones diferentes. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 1.48-4.72 y de 3.11-10.7%, respectivamente.

Los datos se presentaron en mg/kg en peso húmedo. El contenido de materia seca del hígado (calculado mediante secado de 10 submuestras diferentes a 80°C hasta alcanzar un peso constante) fue de 24.9±3.1 sin existir diferencias entre los perros afectados y los del grupo control. Las concentraciones de Cu en tejido hepático menores de 100 mg/kg peso húmedo (<400mg/kg peso seco), fueron consideradas como fisiológicamente normales (Thornburg, 2000; Webb et al., 2002; Hoffmann et al., 2006; Johnston et al., 2013).

2.3. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando SPSS para Windows (v. 20.0). Los gráficos se realizaron con In vivo StatGraphics. La distribución normal de los datos se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las concentraciones de elementos tóxicos no presentaron una distribución normal y por tanto, las concentraciones de elementos tóxicos están expresadas como mediana y rango, y las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante pruebas no paramétricas. Las diferencias entre las concentraciones de Cu en perros afectados por HC y los controles fueron determinadas mediante la prueba de *t*-Student. La diferencia entre las concentraciones hepáticas de elementos traza y elementos tóxicos en animales afectados con HC, asociada o no a la acumulación de Cu, y el grupo control, fueron evaluados mediante ANOVA de una vía con análisis *post hoc* con el test de Tukey HSD. La correlación entre las concentraciones de Cu y los elementos tóxicos y esenciales se realizó por análisis de correlación de Pearson con corrección de Bonferroni, considerando una significancia de $P < 0.05$.

3. Resultados

La **Figura 1** muestra la concentración hepática de Cu en los grupos HC y control (C). Las concentraciones de Cu fueron significativamente mayores ($P < 0.001$) en perros afectados por enfermedad hepática comparado con el grupo control. En el grupo HC las concentraciones de Cu estuvieron entre 4-218 mg/kg de peso húmedo (p.h.) (media 74 mg/kg). Siete animales mostraron niveles de Cu por encima del rango normal (100 mg/kg p.h., (Puls R, 1994)); de estos animales, cinco eran hembras y dos machos, tres eran animales de razas susceptibles (dos Doberman pinscher, un caniche), un pastor alemán y tres de cruce. En el grupo control C, la concentración media de Cu fue de 38 mg/kg (rango de 3 a 68 mg/kg); ningún animal presentó niveles por encima del rango normal.

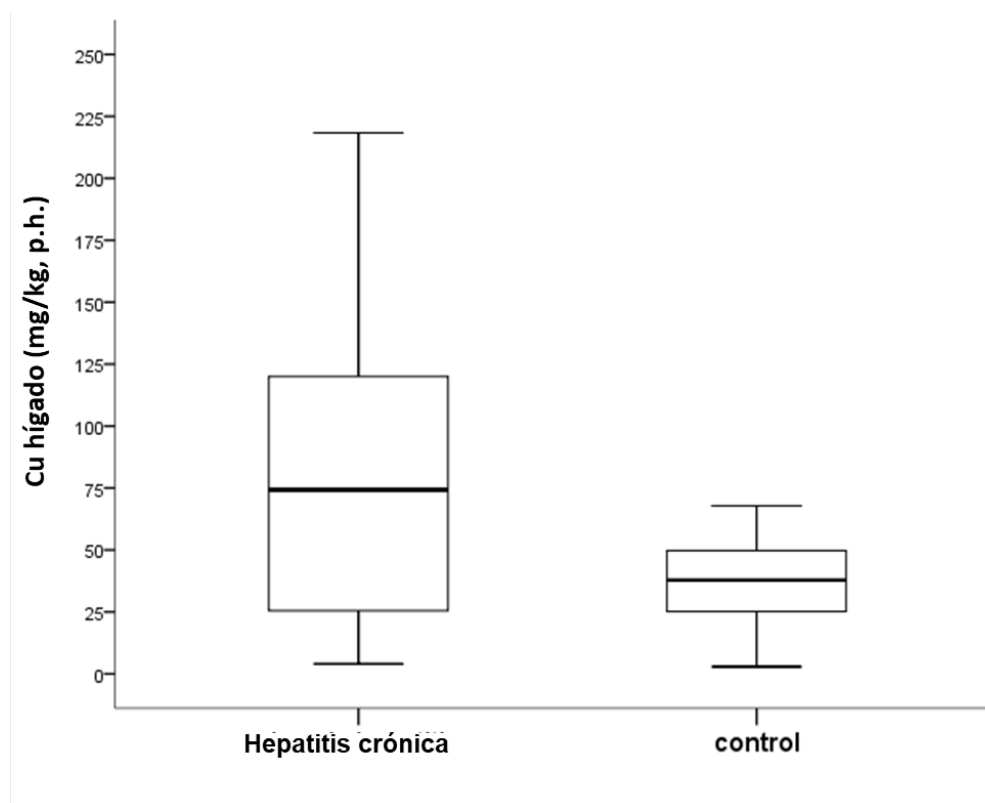


Figura 1. Gráfico que muestra la concentración hepática de Cu en perros del grupo hepatitis crónica (HC) y del grupo control (C).

Se identificaron tres categorías en base a las concentraciones de Cu en hígado: perros con HC con Cu hepático mayor a 100 mg/kg p.h. (HCAC, hepatitis crónica asociada a Cu); perros con HC con Cu hepático menor a 100 mg/kg p.h. (HCNAC, hepatitis crónica no asociada a Cu) y perros control (C).

Las concentraciones hepáticas de elementos traza (Co, Fe, Mn, Mo, Se y Zn) en perros de los tres grupos; HCAC (Cu>100) (n=7); HCNAC (Cu<100) (n=13) y C (n=20) se presentan en la **figura 2**. Los perros con la mayor concentración de Cu, (HCAC) mostraron niveles estadísticamente superiores ($P<0.001$) de Co (33.3), Mn (2.95) y Zn (67.3) comparados con los grupos HCNAC y C, los cuales no mostraron diferencias entre ellos (Co: 10.1 y 12.9; Mn 2.15 y 2.19; Zn: 43.7 y 43.6, respectivamente). Un patrón similar (aunque sin significancia estadística) se encontró para Fe y Mo (HCAC>HCNAC>C). Mientras que para el Se las concentraciones fueron similares en los tres grupos.

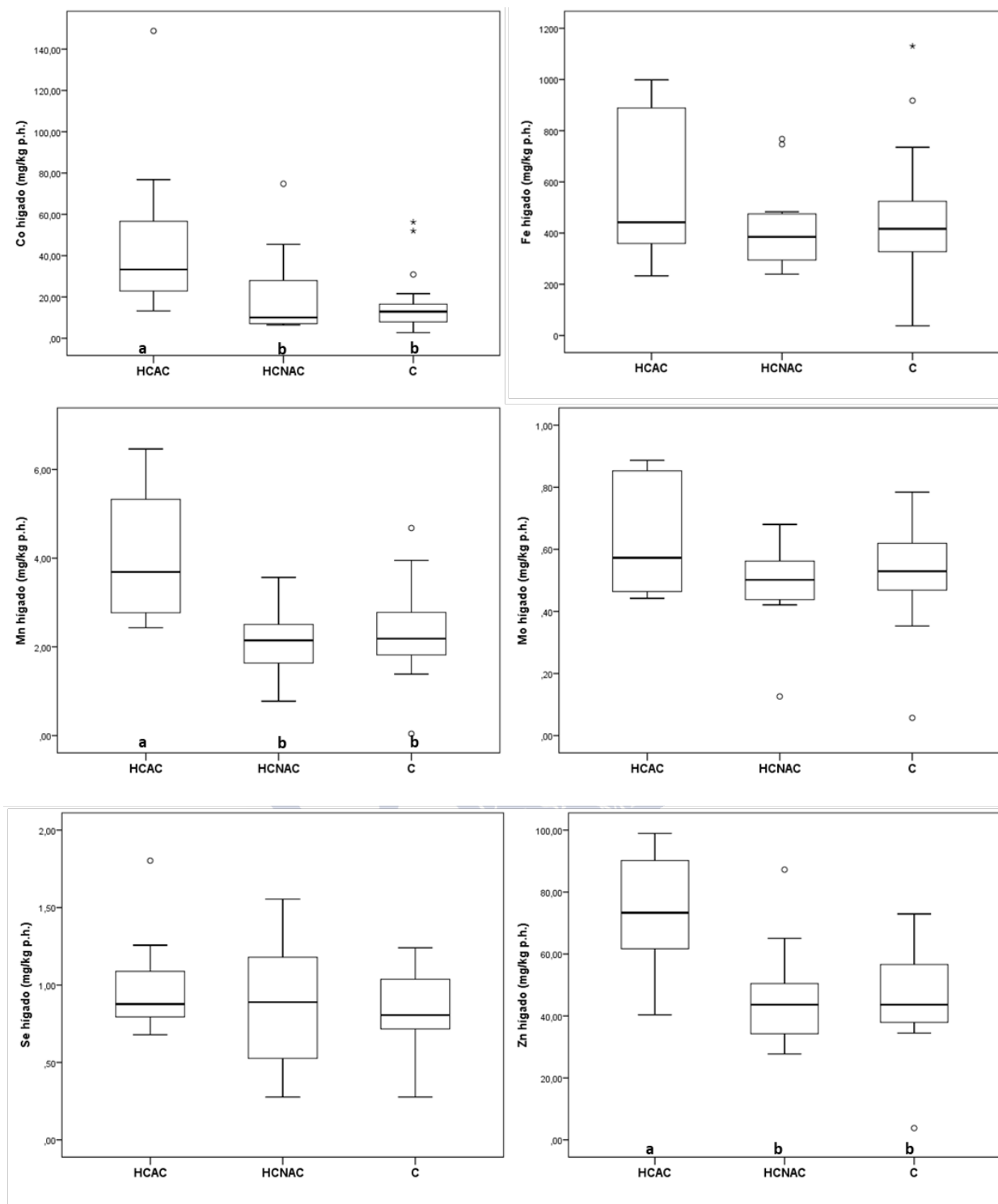


Figura 2. Gráficos que muestran niveles hepáticos de Co, Fe, Mn, Mo, Se y Zn en perros con hepatitis crónica asociada a Cu, niveles de Cu en hígado >100 mg/kg p.h., (HCAC, n=7); hepatitis crónica no asociada a Cu, niveles de Cu en hígado <100 mg/kg p.h. (HCNAC, n=13) y grupo control (C, n=20). Diferentes letras muestran diferencias significativas P<0.001.

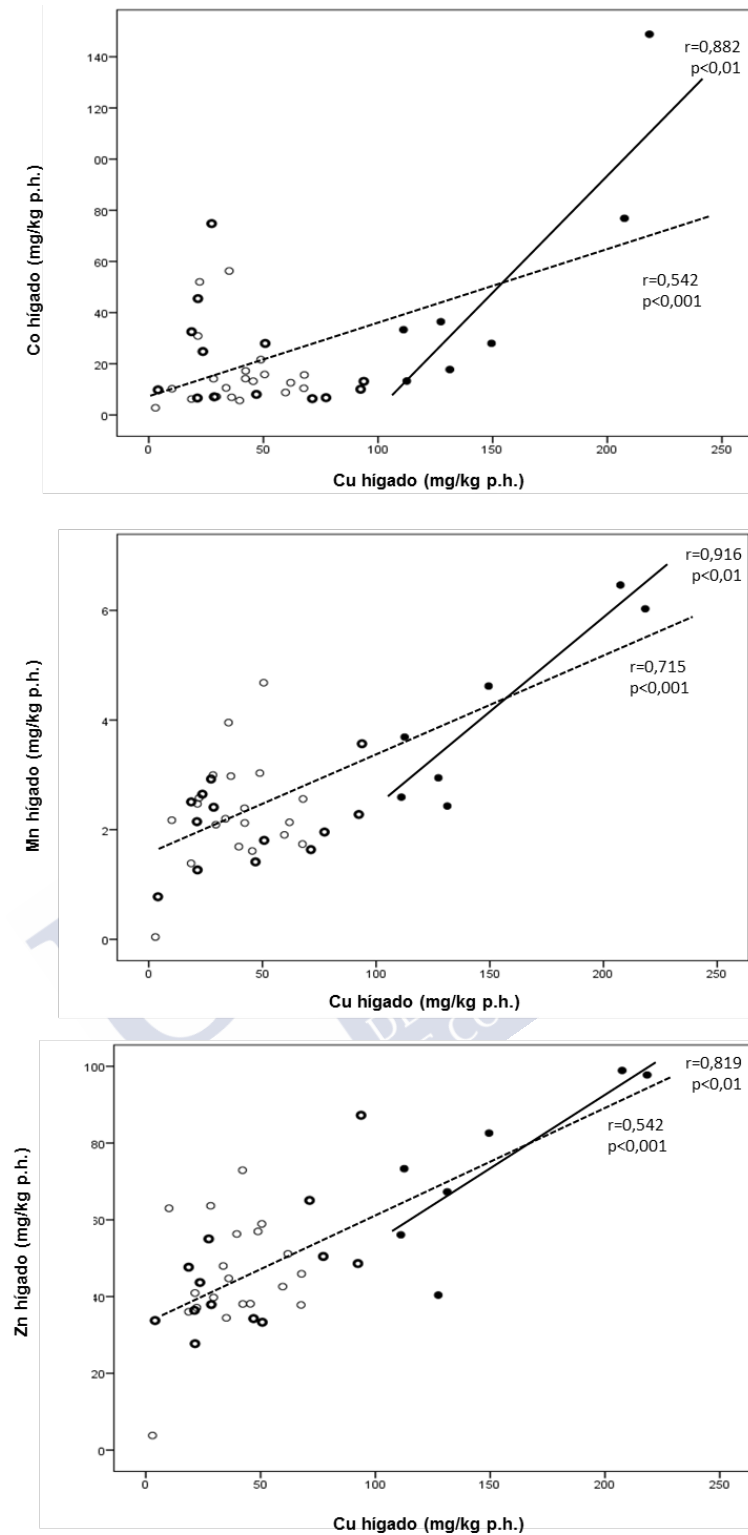


Figura 3. Gráficos de dispersión mostrando la correlación entre las concentraciones de Cu y los elementos esenciales Co, Mn y Zn. Línea discontinua (----) todos los animales (● hepatitis crónica asociada a Cu (HCAC, n=7); ○ hepatitis crónica no asociada a Cu (HCNAC, n=13); ○ grupo control (C, n=20)). Línea continua (____) animales con hepatitis crónica asociada a Cu (HCAC, n=7).

En la **Figura 3** se presentan las correlaciones con significancia estadística ($P<0.001$) entre Cu y los elementos esenciales Co, Mn y Zn en el hígado. Al considerar el conjunto de todos los animales del estudio observamos que la concentración de Cu estuvo correlacionada positivamente con Co: $r=0.542$, $P<0.01$; Mn: $r=0.715$, $P<0.01$ y Zn: $r=0.546$, $P<0.01$. Si bien cabe destacar que al analizar únicamente al grupo hepatitis crónica asociada a Cu (HCAC, $Cu>100$), las asociaciones fueron mayores (a pesar del bajo número de muestra) y mostraron mayor pendiente, así; Co: $r=0.882$, $P<0.001$; Mn: $r=0.916$, $P<0.001$ y Zn: $r=0.819$, $P<0.001$.

Las concentraciones hepáticas de metales tóxicos (As, Cd, Hg y Pb) en perros de los grupos HCAC, HCNAC y C se presentan en la **tabla 2**. Las concentraciones de elementos tóxicos fueron bajas en todos los grupos y siempre por debajo del umbral asociado a toxicidad de acuerdo con Puls (Puls R, 1994).

Tabla 2. Niveles de metales tóxicos ($\mu\text{g/kg}$ peso húmedo) en hígado en perros con hepatitis crónica asociada a Cu (HCAC, $n=7$); hepatitis crónica no asociada a Cu (HCNAC, $n=13$) y grupo control (C, $n=20$).

	HCAC		HCNAC		C	
	media \pm ES	rango	media \pm ES	rango	media \pm ES	rango
As	10.4 \pm 1.2	7.5-16.4	22.3 \pm 7.4	3.7-92.0	13.0 \pm 2.0	6.7-41.8
Cd	112 \pm 21	38-195	78 \pm 24	16-336	101 \pm 29	7-606
Hg	61.5 \pm 26.6	6.8-214.9	61.4 \pm 12.1	3.4-146.4	56.7 \pm 13.4	3.4-207.1
Pb	110 \pm 34	28-245	61 \pm 13	15-163	67 \pm 13	11-253

4. Discusión

A pesar del reducido número de la muestra de estudio, nuestros resultados indican que el perfil de los perros afectados de hepatitis crónica es similar a otros estudios previos (Poldervaart et al., 2009; Bexfield et al., 2012; Kilpatrick et al., 2014). Está bien asumido que algunas razas muestran una mayor incidencia de hepatitis crónica, incluyendo al Doberman pinscher, Cocker americano e inglés y caniches. El 40% (8 de 20) de los perros de nuestro estudio eran cruces o mestizos. A pesar de que está documentado que los cruces pueden ser afectados por hepatitis crónica (Thornburg et al., 1990; Rothuizen and Twedt, 2009); existe poca información al respecto, lo que hace difícil la comparación. Los

perros de razas cruzadas representan un grupo muy heterogéneo, claramente diferentes en número y mezcla de razas en los diferentes países y posiblemente con diferente acceso a los servicios veterinarios en comparación con los perros de raza pura. Aunque existen diferencias por razas, las hembras están generalmente más afectadas que los machos (Watson, 2004; Bexfield et al., 2012) y la edad media al diagnóstico es de alrededor de 6 a 8 años (con un rango de 5 meses a 18 años) (Poldervaart et al., 2009; Bexfield et al., 2012; Kilpatrick et al., 2014; Rifkin and Miller, 2014).

Siete de los 20 perros (35%) afectados por HC en nuestro estudio mostraron niveles hepáticos de Cu por encima del rango normal (100 mg/kg p.h. o 400 mg/kg peso seco (p.s.)) (Thornburg, 2000; Webb et al., 2002; Hoffmann et al., 2006; Johnston et al., 2013). Existe poca información disponible, pero nuestros datos concuerdan con un estudio previo en los Países Bajos, que demostró que el 36% de los casos de hepatitis primaria presentaron incremento en la acumulación de Cu en secciones de tejido hepático teñidas con ácido rubeánico (Poldervaart et al., 2009). Una vez más, algunas razas están claramente relacionadas con esta patología. El único trastorno genético identificado es el que afecta al Bedlington terrier (van De Sluis et al., 2002). En otras razas las alteraciones primarias del metabolismo de Cu son más complejas y no se han determinado completamente. En el Labrador retriever, también se ha propuesto la existencia de un defecto genético (Hoffmann et al., 2006; Johnston et al., 2013). En el Dálmata, en perros jóvenes, la hepatitis crónica asociada al Cu, presenta características similares con la enfermedad del Bedlington y podría considerarse un defecto primario en el metabolismo de Cu hepático (Webb et al., 2002). En otras razas, la hepatitis crónica asociada al Cu aparenta estar sobrerrepresentada, como en el caso del Doberman pinscher (Mandigers et al., 2004), West Highland white terrier (Thornburg et al., 1986) y Skye terrier (Haywood et al., 1988), pero en ninguna de estas parece ser una verdadera enfermedad de almacenamiento como ocurre en el Bedlington terrier. El Cu no incrementa con la edad de estos animales y los niveles de Cu hepático almacenado no se correlacionan con el grado de enfermedad subyacente, o no aparecen en etapas tempranas de la enfermedad (Thornburg, 2000). En estas razas, la acumulación de Cu parece ser secundaria a lesión hepática colestática (Rothuizen and Twedt, 2009). La acumulación de Cu debe entonces ser entendida como causa y/o efecto de la hepatitis crónica. En general, la susceptibilidad a la acumulación tiene una base genética y la expresión de la enfermedad está dada por factores ambientales como la alimentación (Fieten et al., 2014). Johnston et al. (Johnston et al., 2013) describen un incremento en el Cu hepático en perros a través del tiempo, lo que refleja un incremento en la ingestión y mayor biodisponibilidad de este elemento en la dieta.

El impacto de una enfermedad hepática primaria en el metabolismo de otros elementos traza ha sido documentado en perros (Schultheiss et al., 2002; Smedley et al., 2009;

Pressler et al., 2010). El Fe es posiblemente el elemento que ha provocado mayor atención, ya que el daño hepático inducido por Cu y Fe se relaciona con el estrés oxidativo provocado por radicales libres (Center, 1999). Una alta proporción de perros en este estudio presentaron concentraciones elevadas de Fe (rango normal 88 a 438 mg/kg p.h. o 350 a 1750 mg/kg p.s., (Smedley et al., 2009)). En nuestro estudio los niveles hepáticos de Fe no fueron significativamente superiores en el grupo HCAC (Cu >100) comparado con los grupos HCNAC (Cu <100) y control, aunque el grupo HCAC presentó la mayor proporción de perros con altas concentraciones de Fe hepático. En un estudio usando perros de varias razas, se encontró que éstos pueden tener un amplio rango de niveles hepáticos de Fe (Schultheiss et al., 2002). Altas concentraciones de Fe en hígado han sido documentadas en perros con hepatitis crónica natural o provocada experimentalmente (Schultheiss et al., 2002; Fuentealba and Aburto, 2003; Smedley et al., 2009). El mecanismo patogénico del Fe en hepatitis crónica, y particularmente en perros con acumulación de Cu, no está totalmente dilucidado y no se han encontrado asociaciones consistentes entre estos dos elementos (Center, 1999). Las concentraciones de Fe y Cu, no parecen incrementar en relación directa entre los dos (Schultheiss et al., 2002). A diferencia del Cu, el Fe no se excreta en la bilis, por tanto los niveles de Fe no estarían influenciados por anomalías en las vías biliares (Center, 1999). En el hígado de perros afectados con hepatitis crónica, el Fe aparece adyacente a zonas con inflamación crónica, dentro de las células de Kupffer en cortes histológicos; lo cual sustentaría la hipótesis de enfermedad hemolítica (Center, 1999). De todas formas, la acumulación de Fe en nuestro estudio parece ser consecuencia de la enfermedad hepática, pero probablemente no sería la causa directa de las lesiones (Schultheiss et al., 2002).

En contraste con la acumulación de Fe, que podría relacionarse con procesos inflamatorios y hemolíticos, el incremento y la interacción del Cu con otros metales esenciales (Zn, Mn y Co), aparenta ser secundario a un fenómeno de colestasis. Las concentraciones hepáticas de Zn fueron estadísticamente superiores en los animales del grupo HCAC (Cu >100) en comparación con el grupo HCNAC (Cu <100), con niveles normales en los tres grupos (<200 mg/kg p.h., o 800 mg/kg p.s. (Schultheiss et al., 2002). El rol del Zn en la hepatitis crónica es aún menos conocido. El Zn es un elemento de relativamente baja toxicidad y sus concentraciones por encima de los niveles fisiológicos son poco comunes en perros con enfermedad hepática (Schultheiss et al., 2002) y no se ha encontrado una correlación del Zn con los niveles de Cu y Fe en lesiones histológicas en perros afectados con hepatitis crónica. Además, mientras algunos perros con hepatitis crónica y acumulación de Cu fueron deficientes los niveles de Zn en el hígado (Webb et al., 2002); en otros, las concentraciones fueron superiores a las de los controles (Schultheiss et al., 2002). Los resultados inconsistentes entre estudios podrían ser explicados considerando las concentraciones relativas de estos dos minerales en el organismo. Es bien conocido que el Cu y el Zn,

comparten propiedades químicas y tienen relaciones metabólicas importantes en la salud animal (Lopez-Alonso et al., 2002)(Lopez-Alonso et al., 2002) debido a su capacidad de inducir y unirse a metalotioneínas (MT). De hecho, estos mecanismos homeostáticos comunes, son la base de la terapia con Zn en la hepatitis crónica. El Zn induce la producción de MT en la mucosa intestinal, atrapando al Cu en el enterocito e impidiendo su absorción (Hoffmann et al., 2009; Fieten et al., 2013). El Zn puede inducir MT en el hepatocito y de este modo protegerlo contra el daño oxidativo provocado por el Cu libre.

El incremento de las concentraciones de Mn en el grupo HCAC (Cu>100) en nuestro estudio podría ser explicado también por un fenómeno de colestasis. Aunque Gow et al (Gow et al., 2015) demostraron que con la resolución del shunt portosistémico congénito en perros se resuelve la encefalopatía hepática, pero observaron que los pacientes siguen teniendo altos niveles de Mn en sangre. El hígado tiene un rol principal en el metabolismo del Mn, y como en la mayoría de elementos que son absorbidos en el tracto gastrointestinal, éste llega al hígado y es excretado en la bilis de tal forma que, aproximadamente, solo el 2% del Mn absorbido alcanza la circulación sistémica (Aschner and Aschner, 2005). La información disponible a cerca del rol del Mn en enfermedad hepática canina es escasa, aunque en estudios recientes se ha demostrado que las concentraciones de Mn en sangre fueron más altas en perros con hepatitis primaria (Kilpatrick et al., 2014) y encefalopatía hepática (Gow et al., 2015). Estudios en humanos han descrito que existe un incremento en las concentraciones de Mn en sangre y su acumulación en el sistema nervioso central (SNC) en pacientes con insuficiencia hepática (Zheng et al., 2011; Tuschl et al., 2013). Se considera que el depósito de Mn en el SNC juega un papel importante en la presentación de encefalopatía hepática y se ha encontrado una relación directa entre las concentraciones de Mn en sangre, su acumulación en el cerebro y la severidad de la encefalopatía en humanos (Bowman et al., 2011).

El Co es un elemento con relativa baja toxicidad, que se acumula poco en tejidos y que ha sido poco estudiado en perros. Aunque la excreción de Co ocurre principalmente por vía renal (Simonsen et al., 2012), una cantidad pequeña, pero significativa se excreta por vía biliar. La colestasis podría explicar las elevadas concentraciones de Co encontradas en animales con HCAC (Cu>100) en nuestro estudio. Pressler et al. (Pressler et al., 2010) describieron que en perros Beagle-Bedlington terrier COMMD+/-, aunque fueran asintomáticos, podrían tener un defecto no caracterizado que producía acumulación hepática de Co. Sin embargo, debido a que los valores de referencia de Co en hígado en perros no han sido establecidos, no se ha podido valorar la relevancia del incremento de las concentraciones de Co en perros con hepatitis crónica.

5. Conclusiones

Cabe señalar que somos conscientes de las limitaciones del presente estudio. Este es un estudio descriptivo inicial, con un grupo heterogéneo de animales y de número limitado, no existen intervalos de referencia en perros para todos los elementos analizados en este trabajo y los rangos de referencia para el Cu están establecidos en base a materia seca y nuestros resultados fueron en base a peso húmedo. Sin embargo, nuestros resultados indican que algunos elementos traza a parte del Cu (principalmente Co, Mn y Zn) están incrementados en el hígado de perros afectados con hepatitis crónica. Teniendo en cuenta que el análisis multi-elemental por ICP-MS es hoy en día relativamente económico, disponible y requiere un tamaño de muestra mínimo, la determinación de los principales minerales traza en el hígado y sus interacciones podrían contribuir a un mejor entendimiento de la enfermedad y mejorar el diagnóstico de la patología hepática en perros.

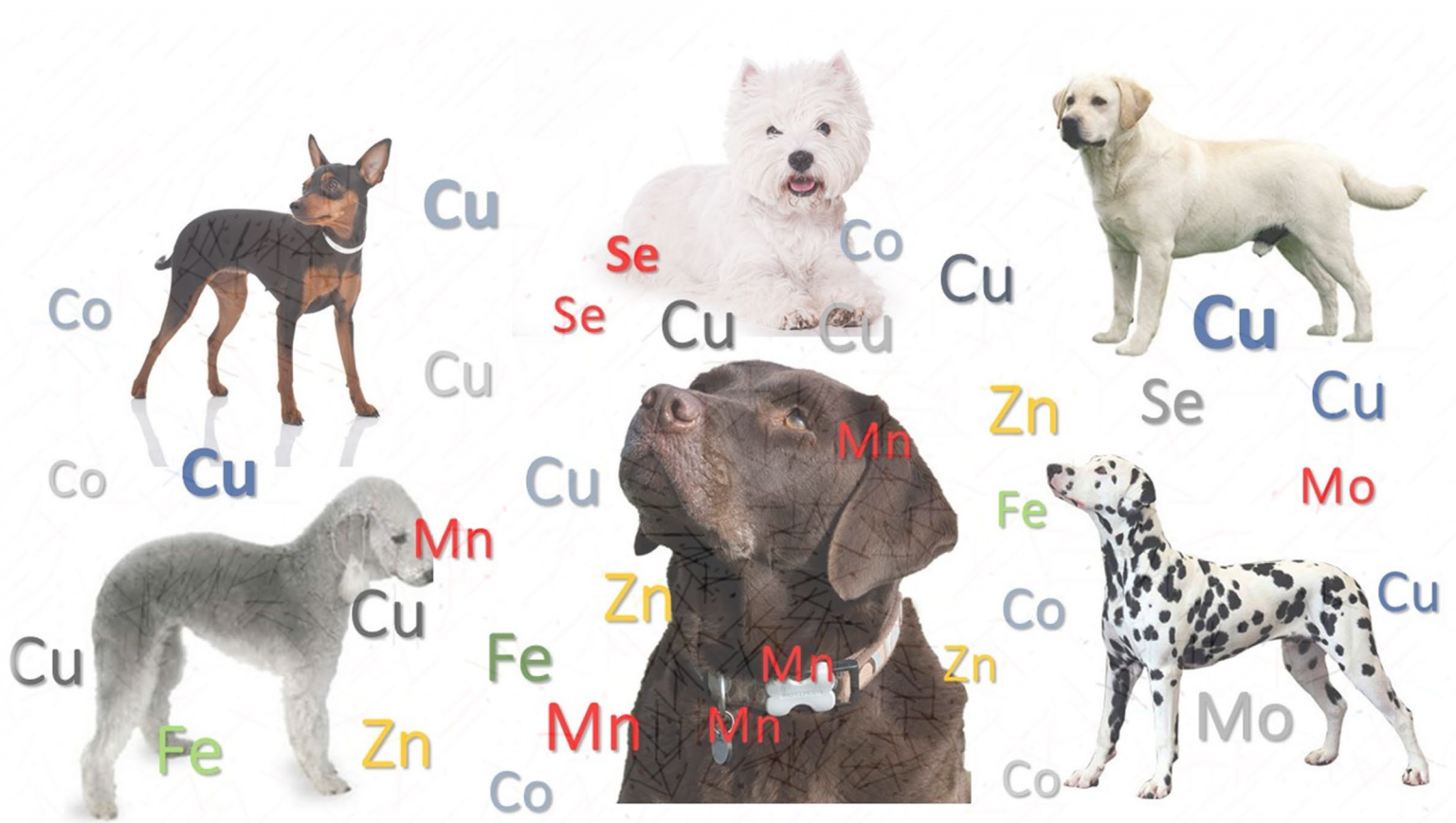
Referencias

- Aschner, J.L., and M. Aschner. 2005. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol. Aspects Med.* 26:353–362. doi:10.1016/j.mam.2005.07.003.
- Bexfield, N.H., R.J. Buxton, T.J. Vitek, M.J. Day, S.M. Bailey, S.P. Haugland, L.R. Morrison, R.W. Else, F. Constantino-Casas, and P.J. Watson. 2012. Breed, age and gender distribution of dogs with chronic hepatitis in the United Kingdom. *Vet. J.* 193:124–128. doi:https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.11.024.
- Bowman, A.B., G.F. Kwakye, E. Herrero Hernández, and M. Aschner. 2011. Role of manganese in neurodegenerative diseases. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25:191–203. doi:10.1016/j.jtemb.2011.08.144.
- Center, S.A. 1999. Chronic liver disease: current concepts of disease mechanisms. *J. Small Anim. Pract.* 40:106–14.
- Fieten, H., K. Dirksen, T.S.G. a M. van den Ingh, E. a. Winter, A.L. Watson, P. a J. Leegwater, and J. Rothuizen. 2013. D-penicillamine treatment of copper-associated hepatitis in Labrador retrievers. *Vet. J.* 196:522–527. doi:10.1016/j.tvjl.2012.12.013.
- Fieten, H., L.C. Penning, P. a J. Leegwater, and J. Rothuizen. 2014. New canine models of copper toxicosis: Diagnosis, treatment, and genetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1314:42–48. doi:10.1111/nyas.12442.
- Fuentealba, I.C., and E.M. Aburto. 2003. Animal models of copper-associated liver disease. *Comp. Hepatol.* 2:5. doi:10.1186/1476-5926-2-5.
- Gow, A.G., P.E. Frowde, C.M. Elwood, C.A. Burton, R.M. Powell, S.W. Tappin, R.D. Foale, A. Duncan, and R.J. Mellanby. 2015. Surgical attenuation of spontaneous congenital portosystemic shunts in dogs resolves hepatic encephalopathy but not hypermanganesemia. *Metab. Brain Dis.* 30:1285–1289. doi:10.1007/s11011-015-9676-y.
- Haywood, S., H.C. Rutgers, and M.K. Christian. 1988. Hepatitis and copper accumulation in Skye terriers. *Vet. Pathol.* 25:408–414. doi:10.1177/030098588802500602.

- Hoffmann, G., T. Van Den Ingh, P. Bode, and J. Rothuizen. 2006. Copper-associated chronic hepatitis in Labrador Retrievers. *J. Vet. Intern. Med.* 20:856–861.
- Hoffmann, G., P.G. Jones, V. Biourge, T.S.G.A.M. van den Ingh, S.J. Mesu, P. Bode, and J. Rothuizen. 2009. Dietary Management of Hepatic Copper Accumulation in Labrador Retrievers. *J. Vet. Intern. Med.* 23:957–963. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0352.x.
- Howell, J.M., and R. Gooneratne. 1987. The pathology of copper toxicity in animals. CRC Press, Florida.
- Johnston, A.N., S.A. Center, S.P. McDonough, J.J. Wakshlag, and K.L. Warner. 2013. Hepatic copper concentrations in labrador retrievers with and without chronic hepatitis: 72 cases (1980-2010). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 242:372–380. doi:10.2460/javma.242.3.372.
- Kilpatrick, S., A. Jacinto, R.D. Foale, S.W. Tappin, C. Burton, P.E. Frowde, C.M. Elwood, R. Powell, A. Duncan, and R.J. Mellanby. 2014. Whole blood manganese concentrations in dogs with primary hepatitis. *J. Small Anim. Pract.* 55:241–246.
- Lopez-Alonso, M., J. Benedito, M. Miranda, C. Castillo, J. Hernández, and R. Shore. 2002. Interactions between toxic and essential trace metals in cattle from a region with low levels of pollution. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42:165–172. doi:10.1007/s00244-001-0012-7.
- Mandigers, P.J.J., T.S.G. a M. van den Ingh, B. Spee, L.C. Penning, P. Bode, and J. Rothuizen. 2004. Chronic hepatitis in Doberman pinschers. A review.. *Vet. Q.* 26:98–106. doi:10.1080/01652176.2004.9695173.
- Mercer, J.F.. B. 2001. The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends Mol. Med.* 7:64–69. doi:10.1016/S1471-4914(01)01920-7.
- Poldervaart, J.H., R.P. Favier, L.C. Penning, T.S.G. a M. Van Den Ingh, and J. Rothuizen. 2009. Primary hepatitis in dogs: A retrospective review (2002-2006). *J. Vet. Intern. Med.* 23:72–80. doi:10.1111/j.1939-1676.2008.0215.x.
- Pressler, B., G. Moore, and R. Favier. 2010. Hepatic and biliary trace element concentrations in healthy dogs versus dogs with hepatopathies. *J. Vet. Intern. Med.* 24:757.
- Puls R. 1994. Mineral Levels in Animal Health. second. Clearbrook: Sherpa International, Canada.
- Rifkin, J., and M.D. Miller. 2014. Copper-associated hepatitis in a Pembroke Welsh corgi. *Can. Vet. J.* 55:573–576.
- Rothuizen, J., S.E. Bunch, J.A. Charles, J.M. Cullen, V.J. Desmet, V. Szatmári, D.C. Twedt, T.S.G.A.M. van den Ingh, T. Van Winkle, and R.J. Washabau. 2006. WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Diseases. Elsevier Health Sciences. Philadelphia, PA, USA
- Rothuizen, J., and D.C. Twedt. 2009. Liver Biopsy Techniques. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 39:469–480. doi:10.1016/j.cvsm.2009.02.006.
- Schultheiss, P.C., C.L. Bedwell, D.W. Hamar, and M.J. Fettman. 2002. Canine liver iron, copper, and zinc concentrations and association with histologic lesions.. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14:396–402. doi:10.1177/104063870201400506.
- Simonsen, L.O., H. Harbak, and P. Bennekou. 2012. Cobalt metabolism and toxicology—A brief update. *Sci. Total Environ.* 432:210–215. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.009.

- van De Sluis, B., J. Rothuizen, P.L. Pearson, B. a van Oost, and C. Wijmenga. 2002. Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population.. *Hum. Mol. Genet.* 11:165–173. doi:10.1093/hmg/11.2.165.
- Smedley, R., T. Mullaney, and W. Rumble. 2009. Copper-associated hepatitis in Labrador Retrievers.. *Vet. Pathol.* 46:484–490. doi:10.1354/vp.08-VP-0197-S-FL.
- Thornburg, L.P. 2000. A perspective on copper and liver disease in the dog.. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:101–110. doi:10.1177/104063870001200201.
- Thornburg, L.P., G. Rottinghaus, M. McGowan, K. Kupka, S. Crawford, and S. Forbes. 1990. Hepatic copper concentrations in purebred and mixed-breed dogs.. *Vet. Pathol.* 27:81–88. doi:10.1177/030098589002700202.
- Thornburg, L.P., D. Shaw, M. Dolan, M. Raisbeck, S. Crawford, G.L. Dennis, and D.B. Olwin. 1986. Hereditary copper toxicosis in West Highland white terriers.. *Vet. Pathol.* 23:148–154. doi:10.1177/030098588602300207.
- Tuschl, K., P.B. Mills, and P.T. Clayton. 2013. Chapter Twelve - Manganese and the Brain. K.P. Bhatia and S.A.B.T.-I.R. of N. Schneider, ed. Academic Press.
- Watson, P.J. 2004. Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of the aetiology, progression, and treatment.. *Vet. J.* 167:228–41. doi:10.1016/S1090-0233(03)00118-7.
- Webb, C., and D. Twedt. 2008. Oxidative stress and liver disease.. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38:125–135, v. doi:10.1016/j.cvsm.2007.10.001.
- Webb, C.B., D.C. Twedt, and D.J. Meyer. 2002. Copper-associated liver disease in Dalmatians: a review of 10 dogs (1998-2001).. *J. Vet. Intern. Med.* 16:665–668. doi:10.1892/0891-6640(2002)016<0665:CLDIDA>2.3.CO;2.
- Zheng, W., S.X. Fu, U. Dydak, and D.M. Cowan. 2011. Biomarkers of manganese intoxication. *Neurotoxicology* 32:1–8. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.10.002.

CONCLUSIONES



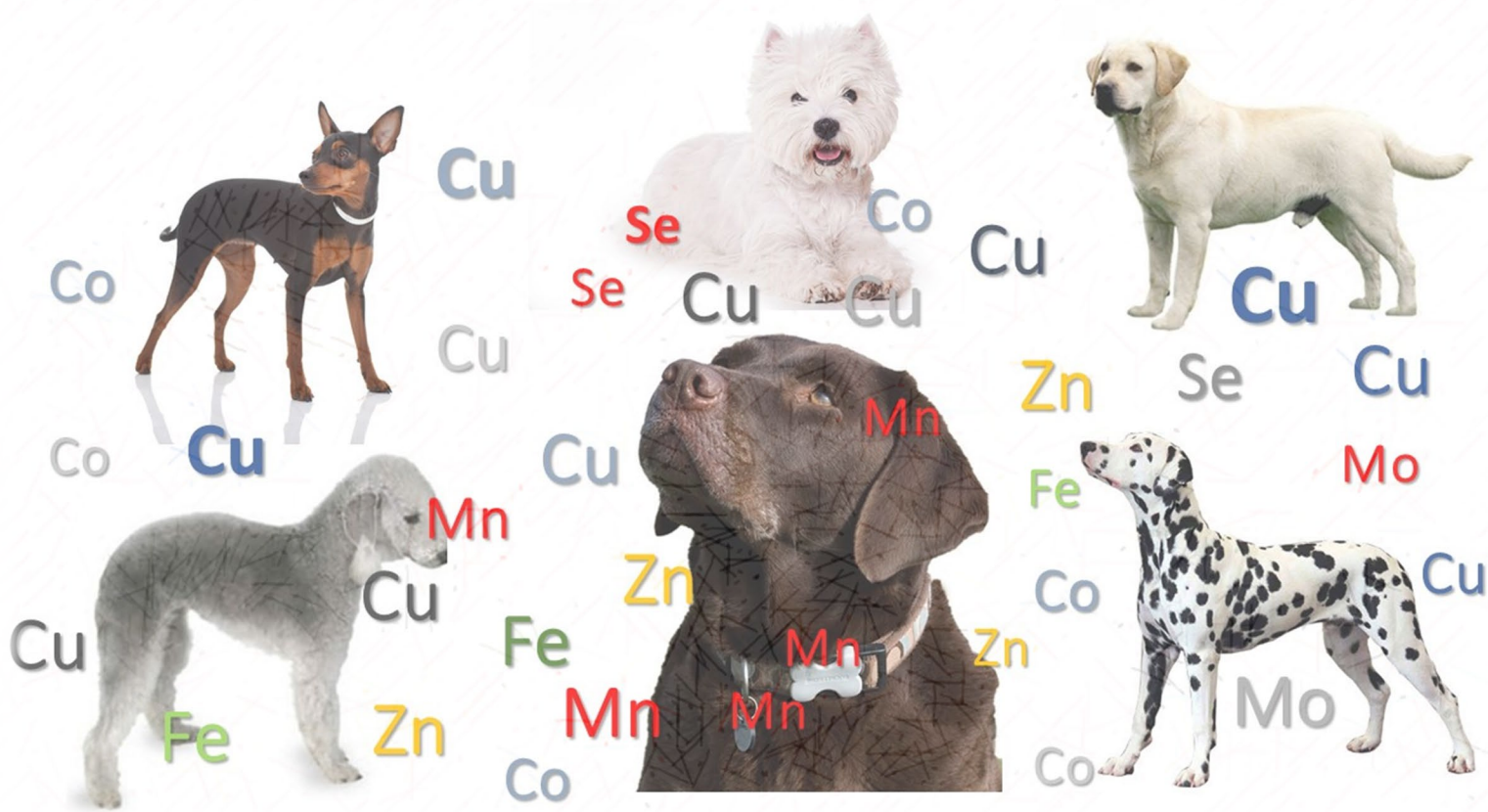
CONCLUSIONES

- I. Los niveles de elementos esenciales y metales tóxicos en suero en una cohorte representativa de perros (región norte de España) ha sido utilizada para establecer rangos de elementos esenciales y el umbral de toxicidad para esta especie animal. Además, se identificaron varias alteraciones clínicas asociadas a variación en los niveles séricos de elementos esenciales. Los patrones de estas variaciones han sido descritos previamente en estudios en medicina humana, donde está disponible una mayor cantidad de información. Nuestros resultados, aunque preliminares, indican que la determinación en suero de elementos esenciales puede aportar información útil en la patogénesis de ciertas enfermedades (como causa o consecuencia). Se necesitan nuevos estudios sobre la concentración de elementos traza en suero y particularmente, en conexión con otros parámetros bioquímicos y herramientas diagnósticas podría ofrecer información importante en el diagnóstico y pronóstico de enfermedad en perros.
- II. Los resultados de nuestro estudio, en una muestra de perros que cubre una gran variedad de trastornos patológicos, indica claramente que los oligoelementos en suero tienen un gran papel durante la enfermedad, particularmente en relación con las reacciones de fase aguda: el Cu como medida indirecta de ceruloplasmina (proteína de fase aguda positiva), el Se y Zn como reactivos de fase aguda negativa. El Mo también podría ser un marcador adecuado de enfermedad renal incipiente. Teniendo en cuenta que hoy en día la determinación de las concentraciones de elementos traza (mediante el uso de la técnica multielemento ICP-MS) es una técnica sencilla y relativamente económica, disponible en numerosos laboratorios de diagnóstico, la determinación del perfil de elementos traza en el suero podría permitir no sólo apoyar el diagnóstico llevado a cabo con otros marcadores bioquímicos, sino también para hacer un mejor pronóstico del riesgo asociado a la deficiencia de los mismos (por ejemplo, Se y Zn podrían ser medidas indirectas del potencial antioxidante representado por la glutatión

peroxidasa y la superóxido dismutasa). Teniendo en cuenta que las deficiencias de elementos traza se asocian con un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad, deberían de llevarse a cabo nuevas investigaciones para estudiar los beneficios potenciales de la suplementación con oligoelementos antioxidantes en pacientes que sufren de una enfermedad grave.

- III. Nuestros resultados indican que algunos elementos traza a parte del Cu (principalmente Co, Mn y Zn) están aumentados en el hígado de perros afectados con hepatitis crónica. Teniendo en cuenta que el análisis multi-elemental por ICP-MS es hoy en día relativamente económico, disponible y requiere un tamaño de muestra mínimo, la determinación de los principales minerales traza en el hígado y sus interacciones podrían contribuir a un mejor entendimiento de la enfermedad y mejorar el diagnóstico de la patología hepática en perros. No obstante, cabe señalar que somos conscientes de las limitaciones del presente estudio. Este es un estudio descriptivo inicial, con un grupo heterogéneo de animales y de número limitado, no existen intervalos de referencia en perros para todos los elementos analizados en este trabajo y los rangos de referencia para el Cu están establecidos en base a materia seca y nuestros resultados fueron en base a peso húmedo.

ANEXOS/PUBLICACIONES



ANEXOS

En este apartado se engloban las publicaciones a las que dio lugar la investigación llevada a cabo durante la realización de esta Tesis Doctoral. Se desarrollaron dos artículos en muestras sanguíneas, uno de ellos en el que se establecen límites de referencia de elementos esenciales y umbral de elementos tóxicos en el perro y como varían estos elementos en función de diferentes patologías (artículo 1 de este anexo), publicado en 2020 en la revista *Animals*; y otro en el que se evalúan la idoneidad del perfil de elementos traza junto a otros parámetros bioquímicos mediante análisis quimiométricos como herramientas adicionales en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (artículo 2 de este anexo), que actualmente está en fase de revisión en la revista *Animals*. Por último, teniendo en cuenta la importancia del cobre en la hepatitis crónica canina nos planteamos evaluar la acumulación de cobre en hígado y su interacción con otros elementos esenciales y tóxicos en perros afectados con hepatitis crónica y perros sanos (artículo 3 de este anexo), publicado en 2016 en la revista *Journal of Small Animal Practice*.



Publicación 1

Yolanda Cedeño, Marta Miranda, Inmaculada Orjales, Carlos Herrero-Latorre, Maruska Suárez, Diego Luna, Marta López-Alonso. 2020. Concentrations of Essential Trace and Toxic Elements in Healthy and Disease-Affected Dogs. *Animals* 10 (7), 1052; doi:10.3390/ani10061052.

Article

Serum Concentrations of Essential Trace and Toxic Elements in Healthy and Disease-Affected Dogs

Yolanda Cedeño ^{1,2}, Marta Miranda ^{3,4,*} , Inmaculada Orjales ^{3,4}, Carlos Herrero-Latorre ⁵ , Maruska Suárez ^{3,4}, Diego Luna ^{1,2}  and Marta López-Alonso ¹

¹ Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Terra, 27002 Lugo, Spain; yoli19mp@hotmail.com (Y.C.); dluna@doctor.com (D.L.); marta.lopez.alonso@usc.es (M.L.-A.)

² Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Central del Ecuador, Quito EC170521, Ecuador

³ Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Terra, 27002 Lugo, Spain; inma.orjales@gmail.com (I.O.); maruska.suarez@usc.es (M.S.)

⁴ Rof-Codina Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Veterinary, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Terra, 27002 Lugo, Spain

⁵ Research Institute on Chemical and Biological Analysis, Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology Department, Faculty of Sciences, Universidade de Santiago de Compostela, Campus Terra, 27002 Lugo, Spain; carlos.herrero@usc.es

* Correspondence: marta.miranda@usc.es

Received: 5 May 2020; Accepted: 15 June 2020; Published: 18 June 2020



Simple Summary: Establishing reference ranges for essential and toxic trace elements in dogs is important to assess health status and to enable assessments of the background levels of toxic element exposure. On the other hand, establishing whether trace element concentrations vary in relation to different pathologies is also important. Serum concentrations of trace elements may be effective diagnostic markers and may help in understanding the pathogenesis of different diseases (and the associated causal relationships).

Abstract: This study was designed (i) to establish reference ranges for the essential trace element and background levels of toxic element exposure in the healthy/normal dog population, and (ii) to evaluate whether trace element concentrations vary in dogs suffering from different pathologies. Blood serum samples were collected from 187 healthy and diseased dogs at the Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela (northwest Spain). The samples were acid digested, and the concentrations of trace elements (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn) and toxic elements (As, Cd, Hg and Pb) were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). This enabled us to establish reference ranges for the essential trace elements and the level of toxic element exposure in dogs, and to identify several clinical situations associated with variations in trace elements in serum. Relative to concentrations in healthy control dogs, statistically significant differences were observed in the concentrations of Cu (significantly higher in hepatic, inflammatory/infectious and oncological categories), Mo (significantly higher in renal category), Se (significantly lower in gastrointestinal category) and Zn (significantly lower in gastrointestinal, inflammatory/infectious and renal categories). Trace element concentrations can be a cause or consequence of disease, and the study findings indicate that trace element determination in serum provides useful information on the pathogenesis of certain diseases. Further research on the serum concentrations of trace elements, particularly in relation to other biochemical parameters and diagnostic tools, may provide valuable information for the diagnosis of diseases in dogs and the disease prognosis.

Keywords: trace and toxic elements; serum; dog; inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)

1. Introduction

Good nutrition is essential for preserving the overall health of organisms. Micronutrients, including trace elements, mediate vital biochemical reactions by acting as cofactors for many enzymes, as well as act as centers for stabilizing structures of enzymes and proteins. Although the essentiality of some elements, such as I and Fe, has been discovered two centuries ago, new and vital roles of trace elements in the pathogenesis of regenerative processes, the responses to oxidative stress in the body tissues, and sustaining immunity against pathogens are still being discovered [1,2]. In humans, trace element deficiencies are known to be associated with reduced antioxidant potential in organisms (possibly underlying the onset of cancer and atherosclerosis), accelerated aging, retarded development in growing individuals, increased incidence of abnormal reproduction, immunological abnormalities and lifestyle-related diseases [1,2]. Although information in animals is scarcer, it is expected that trace elements are also involved in the pathogenesis of numerous diseases. For example, Cu [3–7] and other trace elements [8] are known to play a role in chronic hepatitis in dogs, and elevated concentrations of Fe and Cu (capable of inducing oxidative damage) have been detected in the brain tissues of Alzheimer's patients and in the brains of humans and animals affected by other neurological disorders [9,10]. A recent study in dogs has suggested the role of Mn, Se and Zn in the pathophysiology and/or treatment of epilepsy, and that anti-convulsant therapy may affect Cu and Mo metabolism [11]. On some occasions, the negative effects may also be due to interactions between trace elements and/or trace element imbalances [12]. Trace elements are therefore attracting attention in relation to prophylactic medicine, and diets are formulated to include specific and well-defined trace element concentrations [13].

One of the most difficult problems concerning trace elements, from both nutritional and clinical points of view, is the difficulty in diagnosing trace element disorders, particularly deficiencies. Even in humans, on which much research has been conducted in the last few decades, few methods enable accurate diagnosis, especially in cases of mild to moderate deficiency/excess [1]. Information about trace element concentrations in the blood and tissues of other species, such as dogs, is very limited (mainly related to Cu-associated hepatitis), and reference ranges have not yet been properly established. Although the traditional determination of trace element concentrations in non-invasive samples, such as blood, is very difficult as trace element concentrations are generally very low—making their determination very imprecise, costly and time consuming—the advances in multielement techniques with very low limits of detection, such as inductively coupled plasma-mass spectrometry; ICP-MS, enable the accurate and precise diagnosis of toxic and trace elements in blood by simple, inexpensive methods. This yields detailed information about the levels of trace elements and enables the diagnosis of associated diseases.

In the present study, the serum concentrations of the main trace elements (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn) and toxic elements (As, Cd, Hg and Pb) were determined in a representative sample (cohort) of dogs in northwest Spain by using a validated ICP-MS method. The first objective of the study was to establish reference ranges of concentrations of the essential trace elements in the healthy/normal dog population and the background level of toxic element exposure in the region. The second objective was to evaluate the potential relationship between serum concentrations of the elements determined and different pathologies in dogs.

2. Material and Methods

2.1. Animals and Sample Collection

Dogs were treated according to Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and the trial complied with the Spanish legislation on animal care (RD 53/2013, 1 February 2013). The procedures applied were supervised by the Bioethics Committee of the Rof-Codina Veterinary Teaching Hospital, University of Santiago de Compostela (Spain).

Data from a total of 187 dogs attending the Rof-Codina Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela (northwest Spain), between November 2015 and April 2017 were used in the present study. In all cases, the dogs were considered eligible for study when blood samples were collected for clinical procedures and when a clear and definitive diagnosis was available. A group of 42 healthy animals (both males and females) attending the hospital for castration procedures was considered a control group after clinical examination and pre-operative examination (hematology and basic biochemistry). The other 145 dogs were clinically affected and were classified according to the pathology diagnosed: cardiorespiratory (CR; $n = 11$), dermatological (D; $n = 11$), gastrointestinal (GI; $n = 24$), hepatic (H; $n = 25$), inflammatory-infection (II; $n = 24$), neurological (N; $n = 13$), oncological (O; $n = 15$) and renal (R; $n = 22$) disease. All animals were adult (age range, 1.2 to 12.4 years) and included 52.4% females ($n = 98$) and 47.6% males ($n = 89$). The male/female proportion was similar in all pathological categories, around 50/50.

2.2. Sample Preparation and ICP-MS Analysis

Blood samples obtained from the cephalic vein were centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Serum was extracted from the samples and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The serum samples were acid digested prior to the determination of trace elements and toxic metals. Briefly, 0.5 mL of serum was mixed with 1 mL concentrated HNO_3 and 0.5 mL H_2O_2 in propylene tubes. The mixture was maintained at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h to allow digestion of the samples. The digest thus obtained was diluted by adding 2.5 mL of ultrapure water. The sample solutions were then centrifuged at 2000 rpm for 5 min and the concentrations of trace elements (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn) and toxic elements (As, Cd, Hg and Pb) were subsequently determined in the supernatant, by ICP-MS (Agilent 7700x ICP-MS system; Agilent Technologies, Tokyo, Japan), according to the analytical procedure described in detail in a previous paper [14].

In order to verify the analytical results obtained, an analytical quality control program was applied. Several analytical blanks (prepared exactly according to the same procedure applied to the serum samples) were included in all batches. The corresponding results were used to calculate the limit of detection (LOD) for each of the elements considered (as 3 times the standard deviation of the blank divided by the slope of the calibration curve). The LOD values obtained were low enough to enable the determination of all elements considered. The accuracy of the method was checked by using certified reference material (CRM) of animal serum NIST-1598a (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MA, USA) as well as a set of samples spiked at the appropriate concentration levels (up to 2–10 times higher than the normal levels in the samples). Overall, good recoveries (90–110%) were achieved for both the CRM and the spiked samples. In addition, the intra-sample precision (assessed from 10 repetitions of the same sample) and inter-assay precision (evaluated by preparing 10 digest solutions of the same sample on different days) were also determined, yielding satisfactory values. The results of this quality control program are presented in Table 1.

Table 1. Results of the analytical quality program applied for the ICP-MS determination of the essential trace and toxic elements in serum of dogs in the present study.

Metal	Detection Limit ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Animal Serum SRM1598a		Spiked Samples
		Certified Value * ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recovery (%)	Recovery * (%)
As	0.039	(0.3)	86.1 ± 6.9	93.8 ± 7.4
Cd	0.014	0.048 ± 0.004	ND	106 ± 8
Co	0.027	1.24 ± 0.07	93.3 ± 5.6	95.1 ± 6.7
Cr	0.025	0.33 ± 0.08	91.2 ± 5.1	91.8 ± 4.4
Cu	0.051	1580 ± 90	92.5 ± 2.5	104 ± 2
Fe	0.053	1680 ± 60	102 ± 8	106 ± 10
Hg	0.019	0.32 ± 0.19	94.1 ± 4.7	89.1 ± 8.4
Mn	0.026	1.78 ± 0.33	112 ± 13	100 ± 7
Mo	0.011	5.5 ± 1.0	98.3 ± 3.7	95.7 ± 6.0
Ni	0.024	0.94 ± 0.18	97.5 ± 4.8	103 ± 7
Pb	0.015	-	-	102 ± 7
Se	0.080	134.4 ± 5.8	97.8 ± 2.3	99.1 ± 7.7
Zn	0.620	880 ± 24	95.8 ± 3.1	101 ± 8

* Expressed as mean \pm SD. In brackets only indicative values. ND: not detected. SRM: standard reference material.

2.3. Data Analysis and Reference Intervals

All statistical analyses were carried out with Statgraphics Centurion XVIII, ver. 18.1.12 (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA). The data distribution was checked using the Kolmogorov–Smirnov (K–S) test. The influence of the pathology on trace and toxic elements was evaluated by ANOVA or the Kruskal–Wallis (K–W) test for categories. The correlations between elements were tested by Pearson’s correlation coefficient. All differences were considered significant at $p < 0.05$.

In clinical chemistry, the reference range (or reference interval) for a variable is the range of values of this variable that is deemed normal in healthy animals. The reference range for a particular variable is the interval including the 95% of the values of a reference population and excluding 2.5 % of the values at either end of the range. The limits of this range, i.e., the lower reference limit (LRL) and the upper reference limit (URL), can be estimated by parametric or non-parametric statistical methods for normal (Gaussian) and non-normal distributions, respectively. In the case at hand, after the K–S test, if the variable considered j was normally distributed, LRL and URL were calculated as $\bar{X}_j - 1.96 SD_j$ and $\bar{X}_j + 1.96 SD_j$, respectively, where \bar{X}_j is the mean of the variable j and SD_j its standard deviation; otherwise, if the variable was not-normally distributed, then LRL and URL were obtained as the 2.5% and 97.5% percentiles [15].

3. Results

The reference intervals for essential trace and toxic element concentrations in serum in the healthy dog population in the present study, calculated as indicated in Section 2.3 according to each variable distribution, are shown in Table 2.

Detailed descriptions of the essential trace and toxic element concentrations in dogs in relation to the pathologies they are suffering are presented in Figure 1. ANOVA revealed statistically significant differences in the essential trace elements for the different groups of pathologies relative to the control group ($p < 0.05$): Cu (significantly higher in hepatic, inflammatory/infectious and oncological categories), Mo (significantly higher in renal category), Se (significantly lower in gastrointestinal illnesses) and Zn (significantly lower in gastrointestinal, inflammatory/infectious and renal categories).

Moreover, detailed analysis of Figure 1 reveals that in the above-described pathologies in which a statistically significant increase in trace elements occurs in the serum (Cu in hepatic, inflammatory/infectious and oncological categories; Mo in renal patients) values were above the upper normal range in more than 25 % of the animals. Although not statistically significant, the same pattern of behavior has been observed for other elements in some pathologies: Co, Fe, Zn, Hg and Pb in

oncological disorders; Ni and Mn in dermatological processes; and Fe in individuals suffering from infection/inflammation and neurological diseases.

Table 2. Descriptive statistic for trace and toxic element concentrations in serum of the healthy/normal dog samples ($n = 42$) and calculated reference intervals. (All results are in $\mu\text{g L}^{-1}$).

Metal	Mean	SD	Median	Normal Distribution (K-S Test)	Reference Interval	
					Lower Reference Limit	Upper Reference Limit
As	1.86	1.44	1.36	NO	0.22	7.89
Cd	ND	-	-	-	-	-
Co	0.10	0.07	0.07	NO	0.07	0.28
Cr	2.73	2.54	2.17	NO	0.63	13.7
Cu	422	148	377	YES	132	712
Fe	1938	639	1939	YES	686	3190
Hg	0.24	0.22	0.16	YES	0.0	0.67
Mn	3.79	1.86	3.47	YES	0.14	7.44
Mo	5.48	3.36	4.35	YES	0.00	12.1
Ni	0.72	0.94	0.06	NO	0.06	3.01
Pb	0.55	0.60	0.30	YES	0.0	1.73
Se	315	82	310	YES	154	447
Zn	489	143	464	YES	209	769

ND: not detected. SD: standard deviation. K-S: Kolmogorov–Smirnov.

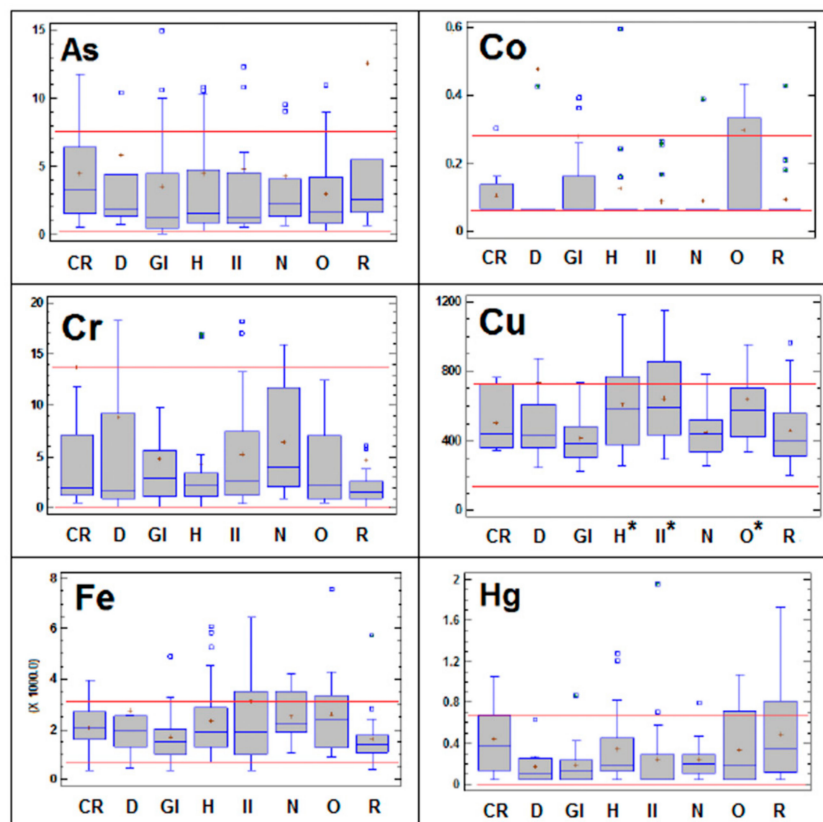


Figure 1. Cont.

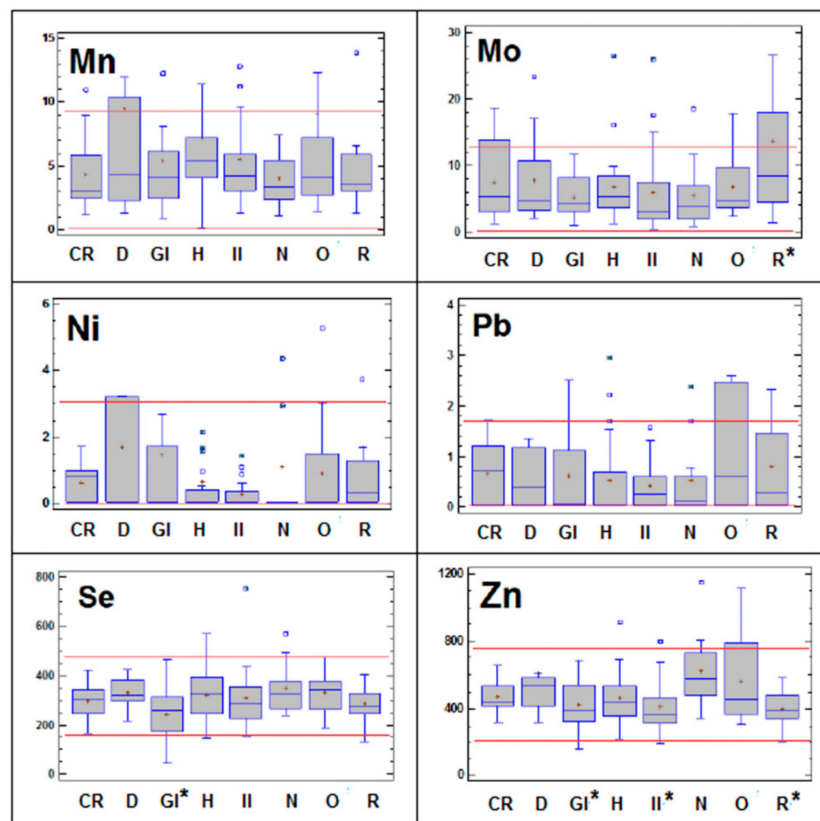


Figure 1. Box-and-whisker plot showing the concentrations of As, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se and Zn in the serum of dogs suffering from cardiorespiratory (CR), dermatological (D), gastrointestinal (GI), hepatic (H), inflammatory-infection (II), neurological (N), oncological (O) and renal (R) diseases. All concentrations are expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$. The r lines represent the lower reference limit and upper reference limit of the reference interval for each variable obtained from healthy control animals. The horizontal blue line within the box symbolizes the median of the variable; the red cross is the mean value; and the lower and upper boundaries of the box represent the first and third quartiles (thus, the box is the interval covering the middle 50% of the values); whiskers are drawn from the edges of the box to the highest and lowest values (except for values unusually far away from the box). In this case, the outliers, i.e., those points more than 1.5 times the interquartile range (box width) above or below the box, are indicated by blue squares. * Indicates statistically significant difference between the pathological group considered and the control group ($p < 0.05$).

4. Discussion

4.1. Reference Intervals of Essential Trace Elements and Levels of Toxic Element Exposure

Information about trace element concentrations in serum or plasma of dogs is very scarce, and reference intervals are not available. As far as we are aware, the only attempt to provide normal or reference ranges in serum of dogs was that made 25 years ago by Puls in a book entitled *Mineral Levels in Animal Health* (1994) [16]. However, the information supplied was limited to the main trace elements, and the absence of knowledge about the origin of these data (including techniques of analysis, limits of detection and other relevant analytical data) prevents its use for comparative purposes. When considering the main essential trace elements, the concentrations of Cu, Fe, Se and Zn in serum from dogs in the present study are reasonably consistent with the normal/adequate range described by Puls [16] in dogs, as well as with other studies published in the literature for this animal species from observational studies (both for the general dog population or healthy control groups; see Table 3).

Table 3. Serum concentrations of essential trace and toxic elements (expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$ and arithmetic mean values) in observational studies in dogs.

Type Study/Country	N	Element												References [16]	
		As	Cd	Co	Cu	Cr	Fe	Mn	Hg	Mo	Ni	Pb	Se		Zn
Reference Values ¹			3–5 ^a		200–800		940–1220	20			1.8–4.2	10–100 ^a	220 ^a	700–2000	
General Dog Population															
Turkey ¹	73			24	830		1320	10			13	100		730	[17]
Poland ^{2,b}	48	556			1363	249	1690	683				489		1523	[18]
Italy ^{2,c}	31	390			780	130		20	510		230	60	230	1970	[19]
Control Healthy Dogs															
India ¹	10			36.6 ± 3.6	1050 ± 21		872 ± 21	172 ± 2						642 ± 10	[20]
USA ^{3,d}	50			0.30	450		1625	3.15	8.45				300	740	[11]
Bulgaria ²	10				946 ± 143			24 ± 5					291 ± 57	1692 ± 180	[21]
Turkey ⁴	10				1006 ± 12		860 ± 199							620 ± 76	[22]
USA ^{1,4}	50					4.66 ± 2.83	1751 ± 567							1220 ± 360	[23]
Turkey ^{4,b}	16				511 ± 59		1543 ± 240	20 ± 1							[24]
Iran ⁴	14				1514 ± 255		1730							593 ± 226	[25]

^a Whole blood, ^b urban area, ^c polluted area, ^d median. Analytical techniques: ¹ atomic absorption spectrophotometer (AAS); ² inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES); ³ inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS); ⁴ UV spectrophotometry.

These values are also consistent with the normal ranges in humans [26] and livestock species, for which more information is available (for a review [16,27]). The results are not surprising, as trace element concentrations in healthy animals receiving adequate diets (most of the control dogs in our study are fed commercial diets fortified with trace elements) are tightly regulated by homeostatic mechanisms. For example, in serum/plasma, 60–70% of Cu is found in ceruloplasmin and corresponds to Cu exported from the liver to tissues; the rest of the Cu is associated with the Cu transport proteins transcuprein (10–30%) and albumin (15–20%), which transport Cu from the intestine to the liver and kidney [5,28]. By contrast, the concentrations of Mn in dogs in the present study are much lower than those considered adequate by Puls [16] (1 order of magnitude) and in other studies in dogs (up to orders of magnitude, see Table 3), but are consistent with those described in studies in dogs [11], humans [26] and ruminants [27] using modern multi-elemental analytical techniques (such as ICP-MS) with very low limits of quantification. The situation for Co is similar, and information in dogs is even scarcer (no data provided by Puls [16]). It should be noted that, the concentrations of both Co (mean: $0.10 \mu\text{g L}^{-1}$) and Mn (mean: $3.79 \mu\text{g L}^{-1}$) were much lower in serum than in other tissues and were very close to the limits of quantification of the analytical technique. In this case, conducting an analytical quality control program, including certified reference materials and spiked samples, is essential for guaranteeing good sample analysis. In fact, Co and Mn results in our study were in the same range of the unique study in dogs using ICP-MS analysis (see Table 3) [11].

Precise information about trace elements that are considered only occasional beneficial (Cr, Mo and Ni) is also very limited for all animal species (except Mo in ruminants, because of its particular antagonism with Cu [12]). These elements are only essential at “ultra-trace concentrations”, well below those found in normal diets, and the clinical consequences of their deprivation are only observed when animals receive experimental purified diets [12]. The minimum serum concentrations required to maintain normal metabolism are not well defined but assumed to be well below those in serum. In the present study, Cr, Mo and Ni concentrations are in the low range of those described in other studies (see Table 3).

Finally, considering the toxic elements, the concentrations of As, Hg and Pb were very low (maximum levels of residue 7.89 , 0.79 , and $1.79 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively), and the concentrations of Cd in all samples were below the limit of detection of the technique. Toxic metals in dogs in the present study are much lower than in other studies in dogs (up to orders of magnitude, see Table 3), and similar results in terms of concentrations have been found in other studies in humans [26] and in cattle from the same geographical region as the present study [29], indicating a low level of environmental exposure in the region.

4.2. Essential Trace and Toxic Element Concentrations in Dogs Suffering from Different Pathologies

We are aware that our study involves a reduced number of samples, and consequently our results must be interpreted with caution. However, it is worth noting that the trace element concentrations in serum that are related to pathological disorders in our study have been previously associated to similar disorders, mainly in humans. In some cases, variations in these trace elements have been proposed as markers of disease and indicative of prognosis [30,31]. The most extensive information is available for Cu, and excessive Cu accumulation in the liver is known to occur in dogs suffering from hepatic disorders [3–8]. Serum copper concentrations are also higher in human patients suffering from hepatic disorders [31], and elevated Cu:Zn ratios have been proposed as markers of disease in patients with hepatic cirrhosis [31] or hepatocellular carcinoma [32]. The role of Cu in the acute-phase protein ceruloplasmin in controlling acute inflammatory-infectious disorders, leading to a marked increase in Cu serum concentrations, is well known in both dogs [22,33] and humans [34]. There is evidence of increased concentrations of Cu and decreased concentrations of Fe and Zn in serum of dogs infected with *Hepatozoon canis* [22] and with *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) [33]. The concentrations of Cu in human serum are increased in various carcinomas [32,35]. Similarly, in a recent study, increased liver Cu and decreased Fe, Se and Zn levels were observed in the livers of

dogs with hepatocellular carcinoma [36]. Changes in Cu and Zn serum and tissue levels have been observed in both human and animal models with neoplasms [31,32,35,36], and it has not yet been established whether altered Cu and Zn concentrations are the cause or the effect of the malignancy. Hence, the usefulness of serum Zn and Cu determinations for cancer prevention, detection, monitoring treatment and prognosis requires further investigation.

A large variety of inflammatory gastrointestinal diseases in dogs are associated with altered Zn metabolism or deficiency, and decreased levels of Zn in the blood of dogs with diarrhea have been reported [37]. Acute and chronic diarrheal disorders may cause Zn deficiency because of increased loss or decreased absorption of the element or altered immunity. When the small intestinal barrier is altered by inflammation, Zn supplementation may help correct the deficiency and also improve the small bowel mucosal capacity to absorb water and electrolytes [38]. Chronic deficiency of Zn increases inflammation, and several pathologies are thus characterized by imbalanced Zn homeostasis [2].

In addition, serum Zn concentrations are low in human patients with some renal clinical disorders, including nephrotic syndrome and renal insufficiency associated with dialysis [30]; urinary Zn excretion increases and symptoms of Zn deficiency are common in these patients. It is not clear whether these disease states are indicative of true symptomatic or asymptomatic Zn deficiency or merely reflect a decrease in available Zn binding proteins. Low serum Zn concentrations and high urinary Zn excretion in patients with nephrotic syndrome do not appear to be due to loss of Zn bound to urinary proteins.

On the contrary, Mo concentrations in serum increase in dogs suffering from renal disorders. This could be related to the ratio of renal excretion since it is their main excretion route. In a recent study in dogs and cats with chronic interstitial nephritis was observed that the ratio of Mo excretion in urine was lower than in healthy animals [39]. In humans, it has been suggested that high serum Mo concentrations could contribute to dialysis-related bone disease in patients requiring long term hemodialysis, as massive Mo accumulation causes joint deformity and arthritis [40].

Selenium deficiency is also known to occur in patients with severe gastrointestinal disorders. Selenium deficiency is mainly related to malabsorption, and low Se levels are almost invariably present in human patients requiring parenteral supplementation due to gut failure [41]. Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of gastrointestinal disease in dogs [37], as it enhances the need for Se and further aggravates the deficiency.

Moreover, many observational studies in human patients have detected a relationship between tumor development and elevated serum concentrations of Co [42–44] and Fe [45,46]. However, evidence for the carcinogenetic potential of Hg or Pb is scarce. As Pb was highly correlated with Cu ($r = 0.89$, $p < 0.001$) and Hg with Fe ($r = 0.69$, $p < 0.001$) in the present study, it is possible that exposure to these metals may have occurred simultaneously in the individuals under study. The presence of high Zn serum levels in the individuals suffering oncological disorders was unexpected as elevated Zn concentrations in serum have not been associated with cancer in previous studies and are even considered a protective factor against tumor development [47,48]. Interestingly, Ni and Mn concentrations above the upper limit in serum were observed in a high proportion of dogs suffering from dermatological disorders. In humans, contact dermatitis associated with Ni is well documented [49,50] and Mn allergic contact dermatitis has also been reported [51,52]. Finally, the Fe concentrations above the normal range in a large proportion of individuals suffering from infection/inflammation and neurological diseases is noteworthy, and the risk to these patients is well documented. Clinical conditions associated with excess Fe in the host may increase the risk for infection, as bacteria require Fe to enable them to multiply in the host, and microbiological studies show a close relationship between Fe availability and bacterial virulence. In human and animal studies, the administration of parenteral Fe during infection has already been shown to be harmful [53]. In the brain, Fe is involved in many fundamental biological processes, including oxygen transport, DNA synthesis, mitochondrial respiration, myelin synthesis, and neurotransmitter synthesis and metabolism. Iron homeostasis is required to maintain normal physiological brain function, whereas faulty regulation of Fe homeostasis

can cause neurotoxicity. A recent study regarding serum concentrations of trace elements in epileptic and healthy dogs described higher Fe levels in untreated epileptics dogs compared to healthy and epileptic dogs with treatment [11]. When Fe concentrations exceed the cellular Fe sequestration capacity of storage proteins or other molecules, the concentration of Fe in the labile Fe pool may increase, with possibly harmful effects [10,54].

5. Conclusions

Information on the main essential trace and toxic elements in the serum of a representative cohort-sample of dogs (in NW Spain) was used to establish reference ranges for the essential trace elements and levels of toxic element exposure. In addition, several clinical situations associated with variations in trace elements in serum were identified. In most cases, the patterns of these variations are consistent with those previously described in studies on elemental serum levels in humans. Our results, although preliminary, indicate that trace element determination in serum could provide useful information about the pathogenesis of certain diseases (and about the associated causal relationships). Further investigation of trace element concentrations in serum, together with other biochemical parameters and diagnostic tools, may provide valuable information regarding the diagnosis of disease and prognosis in dogs.

Author Contributions: Conceptualization, Y.C., M.M. and M.L.-A.; Resources, Y.C., I.O., M.S. and D.L.; Investigation, Y.C., M.M., I.O., M.S. and M.L.-A.; Methodology, Y.C., I.O. Data curation and Software, C.H.-L. and M.L.-A.; Formal analysis, Y.C., M.M., and M.L.-A.; Supervision, M.M. and M.L.-A.; Writing—original draft, Y.C., M.M., C.H.-L. and M.L.-A.; Writing—review and editing, Y.C., M.M. and M.L.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors thank Rof-Codina Veterinary Teaching Hospital and RIAIDT-USC, University of Santiago de Compostela, for the use of clinical and analytical facilities.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wada, O. What are Trace Elements? *J. Jpn. Med. Assoc.* **2004**, *47*, 607–612.
2. Bonaventura, P.; Benedetti, G.; Albarède, F.; Miossec, P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun. Rev.* **2015**, *14*, 277–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Johnston, A.N.; Center, S.A.; McDonough, S.P.; Wakshlag, J.J.; Warner, K.L. Hepatic copper concentrations in labrador retrievers with and without chronic hepatitis: 72 cases (1980–2010). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2013**, *242*, 372–380. [[CrossRef](#)]
4. Fieten, H.; Leegwater, P.A.J.; Watson, A.L.; Rothuizen, J. Canine models of copper toxicosis for understanding mammalian copper metabolism. *Mamm. Genome* **2012**, *23*, 62–75. [[CrossRef](#)]
5. Wu, X.; Leegwater, P.A.J.; Fieten, H. Canine models for copper homeostasis disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Strickland, J.M.; Buchweitz, J.P.; Smedley, R.C.; Olstad, K.J.; Schultz, R.S.; Oliver, N.B.; Langlois, D.K. Hepatic copper concentrations in 546 dogs (1982–2015). *J. Vet. Intern. Med.* **2018**, *32*, 1943–1950. [[CrossRef](#)]
7. Webster, C.R.L.; Center, S.A.; Cullen, J.M.; Penninck, D.G.; Richter, K.P.; Twedt, D.C.; Watson, P.J. ACVIM consensus statement on the diagnosis and treatment of chronic hepatitis in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2019**, *33*, 1173–1200. [[CrossRef](#)]
8. Cedeño, Y.; López-Alonso, M.; Miranda, M. Hepatic concentrations of copper and other metals in dogs with and without chronic hepatitis. *J. Small Anim. Pr.* **2016**, *57*, 703–709. [[CrossRef](#)]
9. Deibel, M.A.; Ehmann, W.D.; Markesbery, W.R. Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: Possible relation to oxidative stress. *J. Neurol. Sci.* **1996**, *143*, 137–142. [[CrossRef](#)]
10. Ward, R.J.; Zucca, F.A.; Duyn, J.H.; Crichton, R.R.; Zecca, L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* **2014**, *13*, 1045–1060. [[CrossRef](#)]

11. Vitale, S.; Hague, D.W.; Foss, K.; de Godoy, M.C.; Selmic, L.E. Comparison of Serum Trace Nutrient Concentrations in Epileptics Compared to Healthy Dogs. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Suttle, N.F. *Mineral Nutrition of Livestock*, 4th ed.; CABI: Wallingford, UK, 2010; ISBN 9781845934729.
13. NRC. *Nutrient Requirements of Dogs and Cats*; National Academies Press: Washington, DC, USA, 2006; ISBN 978-0-309-08628-8.
14. Luna, D.; Miranda, M.; Minervino, A.H.H.; Piñeiro, V.; Herrero-Latorre, C.; López-Alonso, M. Validation of a simple sample preparation method for multielement analysis of bovine serum. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0211859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Poulson, O.M.; Holst, E.; Christensen, J.M. Calculation and application of coverage intervals for biological reference values (Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 1601–1611. [[CrossRef](#)]
16. Puls, R. *Mineral Levels in Animal Health*, 2nd ed.; Sherpa International: Clearbrook, BC, Canada, 1994.
17. Mert, H.; Mert, N.; Dogan, I.; Cellat, M.; Yasar, S. Element status in different breeds of dogs. *Biol. Trace Elem. Res.* **2008**, *125*, 154–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tomza-Marciniak, A.; Pilarczyk, B.; Bąkowska, M.; Ligocki, M.; Gaik, M. Lead, cadmium and other metals in serum of pet dogs from an urban area of NW Poland. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *149*, 345–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Zaccaroni, A.; Corteggio, A.; Altamura, G.; Silvi, M.; Di Vaia, R.; Formigaro, C.; Borzacchiello, G. Elements levels in dogs from “triangle of death” and different areas of Campania region (Italy). *Chemosphere* **2014**, *108*, 62–69. [[CrossRef](#)]
20. Dash, S.K.; Singh, C.; Singh, G. Mineral status in female dogs with malignant mammary gland tumors fed with different habitual diets. *Explor. Anim. Med. Res.* **2018**, *8*, 59–63.
21. Enginler, S.O.; Toydemir, T.S.F.; Ates, A.; Ozturk, B.; Erdogan, O.; Ozdemir, S.; Kirsan, I.; Or, M.E.; Arun, S.S.; Barutcu, U.B. Examination of oxidative/antioxidative status and trace element levels in dogs with mammary tumors. *Bulg. J. Agric. Sci.* **2015**, *21*, 1086–1091.
22. Seyrek, K.; Karagenc, T.; Paşa, S.; Kiral, F.; Atasoy, A. Serum Zinc, Iron and Copper Concentrations in Dogs Infected with Hepatozoon canis. *Acta Vet. Brno* **2009**, *78*, 471–475. [[CrossRef](#)]
23. Kazmierski, K.J.; Ogilvie, G.K.; Fettman, M.J.; Lana, S.E.; Walton, J.A.; Hansen, R.A.; Richardson, K.L.; Hamar, D.W.; Bedwell, C.L.; Andrews, G.; et al. Serum zinc, chromium, and iron concentrations in dogs with lymphoma and osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **2001**, *15*, 585–588. [[CrossRef](#)]
24. Kim, M.J.; Oh, H.J.; Park, J.E.; Kim, G.A.; Park, E.J.; Jang, G.; Lee, B.C. Effects of mineral supplements on ovulation and maturation of dog oocytes. *Theriogenology* **2012**, *78*, 110–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Soltanian, A.; Khoshnegah, J.; Heidarpour, M. Comparison of serum trace elements and antioxidant levels in terrier dogs with or without behavior problems. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **2016**, *180*, 87–92. [[CrossRef](#)]
26. Forrer, R.; Gautschi, K.; Lutz, H. Simultaneous measurement of the trace elements Al, As, B, Be, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Rb, Se, Sr, and Zn in human serum and their reference ranges by ICP-MS. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *80*, 77–93. [[CrossRef](#)]
27. Herdt, T.H.; Hoff, B. The Use of Blood Analysis to Evaluate Trace Mineral Status in Ruminant Livestock. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pr.* **2011**, *27*, 255–283. [[CrossRef](#)]
28. Liu, N.; Lo, L.S.L.; Askary, S.H.; Jones, L.T.; Kidane, T.Z.; Nguyen, T.T.M.; Goforth, J.; Chu, Y.H.; Vivas, E.; Tsai, M.; et al. Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. *J. Nutr. Biochem.* **2007**, *18*, 597–608. [[CrossRef](#)]
29. Luna, D.; López-Alonso, M.; Cedeño, Y.; Rigueira, L.; Pereira, V.; Miranda, M. Determination of Essential and Toxic Elements in Cattle Blood: Serum vs Plasma. *Animals* **2019**, *9*, 465. [[CrossRef](#)]
30. Bhogade, R.B.; Suryakar, A.N.; Joshi, N.G. Effect of Hemodialysis on Serum Copper and Zinc Levels in Renal Failure Patients. *Eur. J. Gen. Med.* **2013**, *10*, 154–157. [[CrossRef](#)]
31. Nangliya, V.; Sharma, A.; Yadav, D.; Sunder, S.; Nijhawan, S.; Mishra, S. Study of Trace Elements in Liver Cirrhosis Patients and Their Role in Prognosis of Disease. *Biol. Trace Elem. Res.* **2015**, *165*, 35–40. [[CrossRef](#)]
32. Lin, C.C.; Huang, J.F.; Tsai, L.Y.; Huang, Y.L. Selenium, iron, copper, and zinc levels and copper-to-zinc ratios in serum of patients at different stages of viral hepatic diseases. *Biol. Trace Elem. Res.* **2006**, *109*, 15–23. [[CrossRef](#)]

33. Da Silva, A.S.; França, R.T.; Costa, M.M.; Paim, C.B.V.; Paim, F.C.; Santos, C.M.M.; Flores, E.M.M.; Eilers, T.L.; Mazzanti, C.M.; Monteiro, S.G.; et al. Influence of *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) on Copper, Iron, and Zinc Bloodstream Levels in Experimentally Infected Dogs. *J. Parasitol.* **2012**, *98*, 1018–1020. [\[CrossRef\]](#)
34. Strecker, D.; Mierzecki, A.; Radomska, K. Copper levels in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2013**, *20*, 312–316.
35. Zowczak, M.; Iskra, M.; Torliński, L.; Cofta, S. Analysis of serum copper zinc concentrations in cancer patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *82*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
36. Harro, C.C.; Smedley, R.C.; Buchweitz, J.P.; Langlois, D.K. Hepatic copper and other trace mineral concentrations in dogs with hepatocellular carcinoma. *J. Vet. Intern. Med.* **2019**, *33*, 2193–2199. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Panda, D.; Patra, R.C.; Nandi, S.; Swarup, D. Oxidative stress indices in gastroenteritis in dogs with canine parvoviral infection. *Res. Vet. Sci.* **2009**, *86*, 36–42. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Sturniolo, G.C.; Di Leo, V.; Barollo, M.; Fries, W.; Mazzon, E.; Ferronato, A.; D’Inca, R. The many functions of zinc in inflammatory conditions of the gastrointestinal tract. *Proc. J. Trace Elem. Exp. Med.* **2000**, *13*, 33–39. [\[CrossRef\]](#)
39. Alborough, R.; Grau-Roma, L.; de Brot, S.; Hantke, G.; Vazquez, S.; Gardner, D.S. Renal accumulation of prooxidant mineral elements and CKD in domestic cats. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3160. [\[CrossRef\]](#)
40. Manuti, J.K.; Al-Rabii, F.G.; Khudayr, M.S. Serum concentration of molybdenum in chronic renal failure patients requiring hemodialysis. *J. Fac. Med. Baghdad* **2011**, *53*, 393–395.
41. Rannem, T.; Ladefoged, K.; Hylander, E.; Hegnhøj, J.; Staun, M. Selenium depletion in patients with gastrointestinal diseases: Are there any predictive factors? *Scand. J. Gastroenterol.* **1998**, *33*, 1057–1061.
42. Kazantzis, G. Role of cobalt, iron, lead, manganese, mercury, platinum, selenium, and titanium in carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **1981**, *40*, 143–161. [\[CrossRef\]](#)
43. Jensen, A.A.; Tuchsén, F. Cobalt exposure and cancer risk. *Crit. Rev. Toxicol.* **1990**, *20*, 427–439. [\[CrossRef\]](#)
44. Suh, M.; Thompson, C.M.; Brorby, G.P.; Mittal, L.; Proctor, D.M. Inhalation cancer risk assessment of cobalt metal. *Regul. Toxicol. Pharm.* **2016**, *79*, 74–82. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Wu, T.; Sempos, C.T.; Freudenheim, J.L.; Muti, P.; Smit, E. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Ann. Epidemiol.* **2004**, *14*, 195–201. [\[CrossRef\]](#)
46. Fonseca-Nunes, A.; Jakszyn, P.; Agudo, A. Iron and cancer risk—a systematic review and meta-analysis of the epidemiological evidence. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2014**, *23*, 12–31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Ho, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J. Nutr. Biochem.* **2004**, *15*, 572–578. [\[CrossRef\]](#)
48. Khayyat-zadeh, S.S.; Maghsoudi, Z.; Foroughi, M.; Askari, G.; Ghiasvand, R. Dietary intake of Zinc, serum levels of Zinc and risk of gastric cancer: A review of studies. *Adv. Biomed. Res.* **2015**, *4*, 118.
49. Purello D’ambrosio, F.; Bagnato, G.F.; Guarneri, B.; Musarra, A.; Di Lorenzo, G.; Dugo, G.; Ricciardi, L. The role of nickel in foods exacerbating nickel contact dermatitis. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **1998**, *53*, 143–145. [\[CrossRef\]](#)
50. Torres, F.; Das Graças, M.; Melo, M.; Tosti, A. Management of contact dermatitis due to nickel allergy: An update. *Clin. Cosmet. Investig. Derm.* **2009**, *2*, 39–48.
51. Leis Dosil, V.M.; Cabeza Martinez, R.; Suarez Fernandez, R.M.; Lazaro Ochaita, P. Allergic contact dermatitis due to manganese in an aluminium alloy. *Contact Dermat.* **2006**, *54*, 67–68. [\[CrossRef\]](#)
52. Tuchinda, P.; Liu, Y.; Tammara, A.; Harberts, E.; Goldner, R.; Gaspari, A.A. Resolution of occupational dermatitis related to manganese exposures. *Dermatitis* **2014**, *25*, 280–281. [\[CrossRef\]](#)
53. Ganz, T. Iron and infection. *Int. J. Hematol.* **2018**, *107*, 7–15. [\[CrossRef\]](#)
54. Murray-Kolb, L.E. Iron and brain functions. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2013**, *16*, 703–707. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)





Publicación 2

Yolanda Cedeño, Marta Miranda, Inmaculada Orjales, Carlos Herrero-Latorre, Maruska Suárez, Diego Luna, Marta López-Alonso. Trace element levels in serum: a valuable diagnosis tool in dogs. *Animals*. *Enviado para publicación*

Article

Trace element levels in serum: a valuable diagnosis tool in dogs

Yolanda Cedeño^{a,b}, Marta Miranda^{c,d*}, Inmaculada Orjales^{c,d}, Carlos Herrero-Latorre^e, Maruska Suárez^{c,d}, Diego Luna^{a,b} and Marta López-Alonso^a

^a Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary, Universidade de Santiago de Compostela. Campus Terra. 27002. Lugo Spain.

^b Faculty of Veterinary Medicine. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.

^c Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary, Universidade de Santiago de Compostela. Campus Terra. 27002. Lugo Spain.

^d Rof-Codina Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Veterinary, Universidade de Santiago de Compostela. Campus Terra. 27002 Lugo, Spain.

^e Research Institute on Chemical and Biological Analysis. Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology Department, Faculty of Sciences. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Terra. 27002 Lugo, Spain.

* Corresponding author: marta.miranda@usc.es

Received: 28 July 2020; Accepted: date; Published: date

Abstract: There is strong evidence in the scientific literature that trace element imbalance occurs in numerous critical diseases in humans and that a low trace element status is related to increased morbidity and mortality; however information in animals, particularly in pets, is very sparse. Our objective was to provide evidence of the role of trace element imbalances on the pathogenesis of certain diseases in dogs and to evaluate the suitability of trace elements as additional tools in the diagnosis and prognosis of the disease. Data of serum trace element concentrations of a cohort of dogs (control-healthy (n= 42) and affected by hepatic (n= 25), gastrointestinal (n= 24), inflammatory/infection (n= 24), and renal (n= 22) diseases) were analyzed together with biochemistry basic parameters (alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALKP), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CREA), albumin (ALB), globulin (GLOB) and glucose (GLU) by using chemometric techniques. Our results clearly indicate that trace elements have a great role during the disease, particularly in relation to acute phase reactions: serum copper as subrogate/indirect measurement of ceruloplasmin (positive acute phase protein), serum selenium and zinc as negative acute phase reactants. Molybdenum could also be a suitable marker of incipient renal disease. Considering that nowadays the determination of trace element concentrations (by using the multielement technique ICP-MS) is a cheap and easy technique available in numerous diagnosis laboratories, the determination of the trace element profile in serum would be an interesting additional tool for the diagnosis of certain diseases, but particularly for the prognosis based on the risk associated to trace element deficiencies.

Keywords: dog; trace elements; biochemical parameters; blood; ICP-MS

1. Introduction

Trace elements are essential micronutrients that play a vital role in many physiological and biochemical processes. As cofactors of multiple key enzymes, they are involved in antioxidant defense, immune response, redox signaling, wound healing and regulation of gene expression among other functions [1]. In spite of trace element requirements are well defined both in humans

[2] and domestic animals (including livestock and pets; [3,4], and food and feed fortification has a nearly century long record of success and safety, proven effective for prevention of specific related diseases [5] mineral deficiency conditions are still widespread worldwide.

Trace element deficiencies/disorders are better studied in humans than in animals. The World Health Organization [6] considers that more than 2 billion people worldwide suffer from vitamin and mineral deficiencies, particularly in developing countries but also in developed countries, affecting people of all genders and ages, as well as certain risk groups. In most cases trace element deficiencies and unbalances are silent epidemics that do not cause specific diseases, but they act as exacerbating factors in infectious and chronic diseases [5]. In the last years, a growing number of publications are reporting trace elements deficiencies and unbalances in various clinical disorders particularly critical illness, including cardiac, hepatic or renal failure, oncology, inflammatory and infection, among others [7–14]. In critically ill patients, oxidative stress is involved in the development of secondary tissue damage and organ failure, and trace elements contributing to the antioxidant defense, mainly selenium (Se) and zinc (Zn) exhibit low serum levels during critical illness [14]. Moreover, the magnitude of the inflammatory response following systemic inflammation is inversely correlated with plasma levels of most micronutrients [15] so that it could almost be expected that the lower the micronutrient level, the greater the likelihood for organ damage and mortality. However, there are still many gaps in knowledge and it is unclear whether the change in plasma levels during critical illness reflect simply the acute-phase response (cellular shifts), a deficiency (alterations of absorption or intake), reduced availability (altered protein-binding) or enhanced metabolism [14].

Although information in veterinary medicine is very scarce, there are also evidences that some pathological disorders can be associated to mineral imbalances. In example, Se and Zn deficiencies have been described in dogs suffering from diarrhea irrespective of its etiology [16]; low levels of Se have been associated to a higher incidence of neoplasms and allergies [17]; increased concentrations of Cu and decreased concentrations of iron (Fe) and Zn in serum of dogs infected with *Hepatozoon canis* [18] and with *Rangelia vitalii* (Apicomplexa: Piroplasmorida) [19]; or increased whole blood manganese (Mn) concentrations in dogs with primary hepatitis [20] or epilepsy [21].

Results of a recent study of our group in NW Spain in a cohort of dogs representative of the local population show significant variations in the main trace elements (namely Cu, Se, Zn and molybdenum (Mo)) in individuals suffering from different pathologies compared to the control-healthy animals [22]. Although preliminary, these results suggest that trace element determination in serum could provide useful information about the pathogenesis of certain diseases. Further investigation of trace element concentrations in serum, together with other markers/biochemical parameters (in example, routinely markers of liver and renal function or inflammation) may provide valuable information regarding the pathogenesis of the disease (identifying symptoms/alterations related to the trace element unbalance; in example, derived of the oxidative damage), the prognosis of the disease (preventing complications) as well as to evaluate the convenience of using trace element supplementation as adjunct therapy. In this study available biochemical data of these cohort of dogs, collected at the same time at which serum for trace element analysis was conducted, was analyzed together with the trace element concentrations in serum by using chemometric analysis. Our objective was to support evidence of the role of trace element imbalances of the pathogenesis of these diseases and to evaluate the suitability of trace elements as additional tools in the diagnosis and prognosis of the disease.

2. Material and methods

2.1. Animals and sample collection

In this study chemical and biochemical information from 137 dogs attended between November 2015 and April 2017 at the Rof-Codina Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, University of Santiago de Compostela (Northwest Spain), were used. Data collection was carried out according to Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes [23] and the trial complied with the Spanish legislation on animal care (RD 53/2013, 1 February 2013)[24]. The procedures applied were supervised by the Bioethics Committee of the University of Santiago de Compostela (Spain).

Detailed information of the dogs has been described in a previous published paper [22]. In the present work, from the initial sample of 187 dogs used in the previous study, only 137 individuals were selected when basic biochemical analytical data was also available. Dogs were classified according their pathologies in five groups: control (n= 42; healthy dogs attending the hospital for castration procedures), hepatic (n= 25), inflammatory-infection (n= 24), gastrointestinal (n= 24) and renal (n= 22) groups. The remaining 50 individuals with other pathologies included in the previous cited study (cardiorespiratory, dermatological, neurological and oncologic) were not considered in the present case due to the low number of samples in each group as well as the absence of complete biochemical analysis.

2.2. Sample preparation and biochemical and ICP-MS analysis

Blood samples obtained from the cephalic vein were centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Biochemical analysis were performed in 1-2 hours after extraction, whereas for trace elements analysis by ICP-MS the samples were stored at -20 °C until analysis of the whole of samples.

Blood samples were analyzed for the following serum biochemical parameters: alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALKP), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CREA), albumin (ALB), globulin (GLOB), and glucose (GLU). For all samples, serum determinations were carried out in the clinic laboratory of the Rof-Codina Veterinary Teaching Hospital using a Catalyst One (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME) analyzer that utilizes dry slide technology and is validated for this type of analysis [25]. Analysis were performed according to the manufacturer's instructions that include automatic software updates, cleaning, and quality control procedures (Quality Control Material, QCM; VetTrol control plus diluent, IDEXX Laboratories). The obtained data were also compared with the reference intervals of each variable (see Table 1).

For ICP-MS analysis serum samples were acid digested and the concentrations of trace elements (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se and Zn) and toxic elements (As, Cd, Hg and Pb) were subsequently determined in the supernatant, by ICP-MS (Agilent 7700x ICP-MS system; Agilent Technologies, Tokyo, Japan). Detailed description of sampling collection, serum preparation and trace element determination by ICP-MS have been described in detail in a previous paper [22].

2.3. Data analysis

All statistical analyses were carried out by using the chemometric and statistical package Statgraphics Centurion XVIII, ver. 18.1.12 (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA). The data distribution of the biochemical parameters was checked using the Kolmogorov-Smirnov (K-S) test and when non-normal data were log-transformed. The influence of the pathology on trace elements was evaluated by using a one-way ANOVA and *post-hoc* analysis. Data were also compared with the reference range. All differences were considered significant at $p < 0.05$.

Table 1. Reference intervals for biochemistry variables.

Variable	Reference interval	Method dry chemistry
ALT	10-125 U/L	LDH (without P5P)
ALKP	23-212 U/L	pNNP+AMP+Mg
BUN	7-27 mg/dL	Urease
CREA	0.5-1.8 mg/dL	Enzymatic colorimetric
ALB	2.2-3.9 g/dL	Bromocresol green
GLOB	2.5-4.5 g/dL	calculation
GLU	70-143 mg/dL	Glucose oxidase, POD

LDH: lactate dehydrogenase; P5P: pyridoxine-5-phosphate; pNNP: *p*-nitro-phenylphosphate; AMP: 2-amino-2-methyl-1-propanol; POD: peroxidase

For the chemometric procedures, the available data for this study were the concentration of 12 metals (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn, As, Hg and Pb) determined by ICP-MS on the serum of the 137 selected dogs of the five groups described above as well as the 7 biochemical variables (ALT, ALKP, BUN, CREA, ALB, GLOB, GLU) that were also measured in the same samples. However, after preliminary assays and likewise considering the results of a previous work in which Cu, Mo, Se and Zn were demonstrated useful elements to be related as potential markers for different diseases, the data set used in this study was a $X_{137 \times 11}$ data matrix in which the files were the 137 selected dogs of the five groups described above, while the columns were the values of these 4 metals considered as interesting markers plus all the 7 measured biochemical variables.

Two multidimensional unsupervised display chemometric techniques have been applied to the study of the latent relationships in the $X_{137 \times 11}$ data matrix. The first one, Hierarchical Cluster Analysis (HCA) is a multidimensional display chemometric procedure that groups the samples or the variables into clusters according to their similarity evaluated in terms of distance between them. In this case, for the estimation of the similarity between samples or variables was carried out using the squared Euclidean distance as similarity measurement and the Ward method (a hierarchical agglomerative procedure) was employed for performing clusters [26]. The final clusters obtained in this technique can be seen as a graphical presentation of the sample or variable clusters in the form of dendrogram, a tree diagram employed for displaying the clusters arrangement produced by HCA. The second technique applied, Principal Component Analysis (PCA), is also a display chemometric technique, commonly used complementarily with HCA, which allows for an examination of the data set in a reduced dimension preserving as much information as possible [27]. PCA transforms the original data matrix $X_{137 \times 11}$ into a product of two matrices, one of which contains information related to the variables (score-matrix) and the other of which contains information related to the loading variables (loadings-matrix). When the number of principal components (PC) selected for the data set visualization is minor than the number of original variables ($n=11$), PCA provides an important simplification of the original data matrix X .

In order to avoid the potential influence of the different size of the original variables, previously to the application of both unsupervised chemometric HCA and PCA techniques, the original data set was autoscaled. Autoscaling procedure is a pretreatment procedure in which each value is subtracted from the mean of the variable and divided by the standard deviation of the variable. The final result is a new set of variables containing exactly the same information than the original ones, but with similar size: all of them with zero mean and unit variance [28].

3. Results

3.1. Biochemical parameters

The results of the basic biochemical parameters evaluated on the dogs of this study are presented in Figure 1 as box-whisker plots for each biochemical variable and group (control, hepatic, gastrointestinal, inflammatory-infection and renal). Overall, all these biochemical parameters are within the biochemical reference intervals (marked with red lines in each plot) of our laboratory for dogs in the control. As expected, statistically significant differences were observed in the dogs suffering from different disorders. ALT was significantly higher in dogs suffering from hepatic disorders, where more than 57% of the dogs above the upper normal range. ALKP were significantly higher in the hepatic, gastrointestinal and inflammatory-infection groups compared to the control; 43 and 33 % of dogs having ALKP values above the normal range within the hepatic and gastrointestinal groups. BUN and CREA were significantly higher in the renal group, where 86 and 54% of animals showed BUN and CREA values above the normal range, respectively. GLOB concentrations were significantly higher in the dogs suffering from hepatic, inflammatory-infection, and renal diseases; in the two last categories 37 and 30% individuals have GLOB concentrations above the physiological normal range. Finally, no statistically significant differences were observed between control and affected dogs for ALB and GLU.

3.2. Chemometric analysis showing the relationship between trace element and biochemical parameters

In order to establish the relationships between the considered variables, HCA were applied to in the $X_{137 \times 11}$ data matrix for the different groups: control, hepatic, gastrointestinal, inflammatory-infection, and renal. In all cases, the similarity between variables were calculated from the squared Euclidean distance between them and the clusters were obtained by Ward agglomerative method. Different and interesting patterns were observed for the different groups. When HCA was applied to control dogs, the resulting dendrogram (see Figure 2) presented two main and well separated clusters. By one hand all the indicative parameters of an adequate liver function in healthy dogs are closely associated, and within them 3 well defined subclusters: ALKP and ALT (indicative of liver damage and cholestasis; in this case absence of) ALB and GLU (indicative of adequate metabolism when being above the low range) and BUN and GLOB (within the normal values indicative of absence of disease). On the other hand, all trace elements (Cu, Mo, Se and Zn) were closely associated and at a relative short distance of CREA (a parameter that in normal healthy individuals is just an indication of the muscle metabolism).

The results obtained when the same HCA procedure was applied to the other four unhealthy classes showed association patterns between trace elements and biochemical parameters completely different for the dogs suffering the different clinical disorders, as it can be seen in Figure 3. The most interesting relationships between trace elements and biochemical variables are the following:

(i) Cu is closely associated to GLOB in the pathological disorders where these proteins are elevated, namely hepatic, inflammatory-infection and renal; in addition in the animals suffering from inflammatory-infection both Cu and GLOB are associated with GLU (reflecting a high GLU consumption of these individuals) and in the renal patients with Se (a trace element that have a renal homeostatic mechanism).

(ii) Mo is closely associated to BUN and CREA in the patients affected by renal and hepatic disorders; this association was expected since Mo has a clear renal homeostatic mechanism of regulation and in both groups a compromise of the BUN and CREA clearance by the kidney can occur. Remarkable is also the close association between ALKP and ALT with Mo in the inflammatory-infection patients.

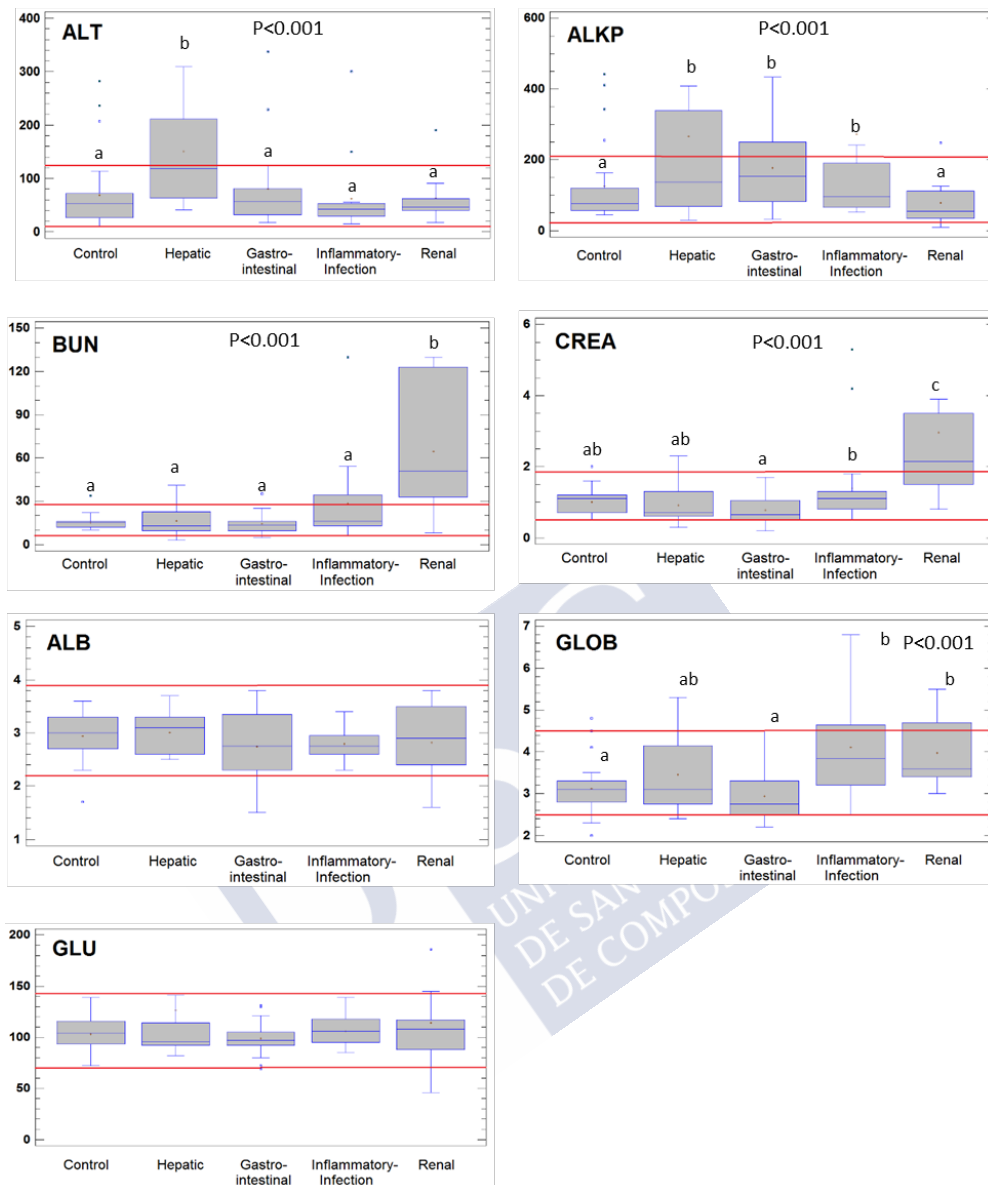
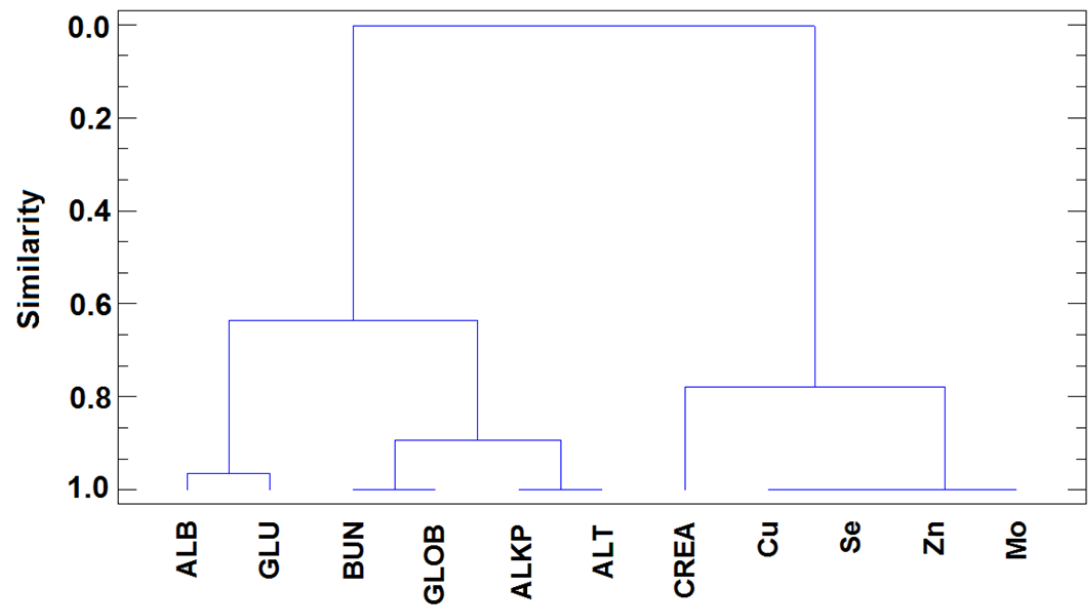


Figure 1. Box-and-whisker plot showing the concentrations of alanine aminotransferase (ALT) (U/L), alkaline phosphatase (ALKP) (U/L), blood urea nitrogen (BUN) (mg/dL), creatinine (CREA) (mg/dL), albumin (ALB) (g/dL), and globulin (GLOB) (g/dL), and Glucose (GLU) (mg/dL) in the serum of healthy-control dogs and suffering from hepatic, gastrointestinal, inflammatory-infection, and renal diseases.

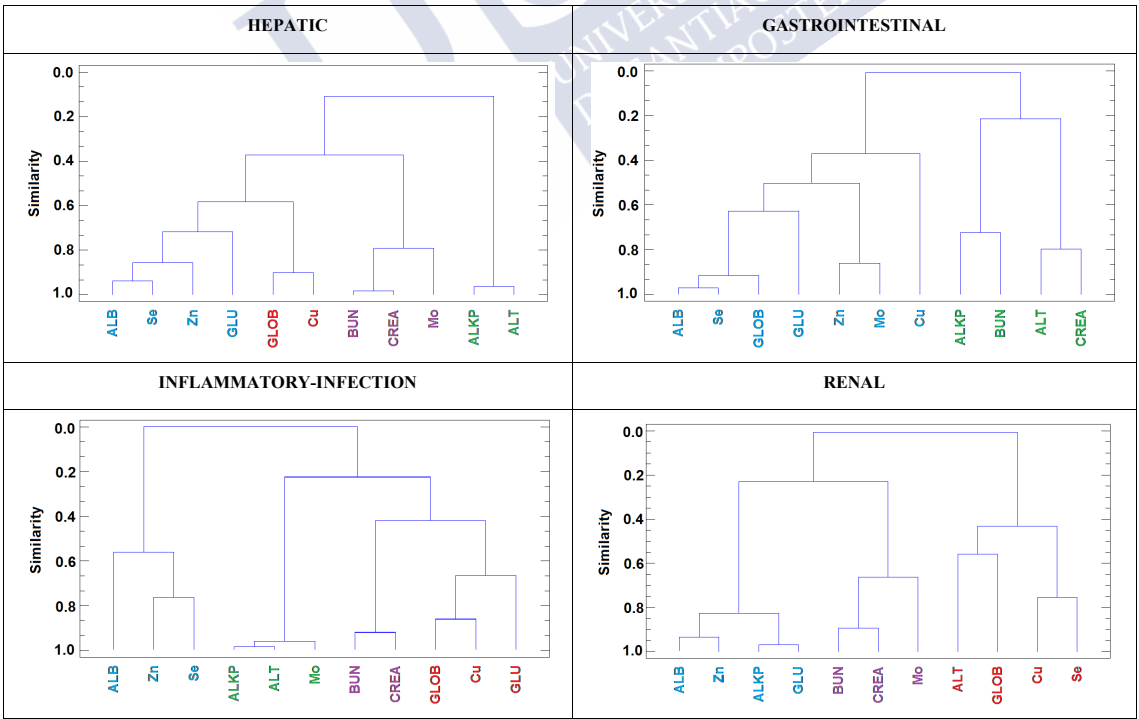
The red lines represent the lower reference limit and upper reference limit of the reference interval for each variable. The horizontal blue line within the box symbolizes the median of the variable; the red cross is the mean value; and the lower and upper boundaries of the box represent the first and third quartiles (thus, the box is the interval covering the middle 50% of the values); whiskers are drawn from the edges of the box to the highest and lowest values (except for values unusually far away from the box). In this case, the outliers, i.e., those points more than 1.5 times the interquartile range (box width) above or below the box, are indicated by blue squares. Different letters indicate statistically significant difference between groups ($p < 0.05$).

239



240
241
242
243
244
245
246
247

Figure 2. Dendrogram obtained by HCA (squared Euclidean distance and Ward agglomerative method) for the control healthy dogs.



248
249
250
251
252

Figure 3. Dendrogram obtained by HCA (squared Euclidean distance and Ward agglomerative method) for the different groups of pathological dogs affected by hepatic, gastrointestinal, inflammatory-infection and renal diseases.

(iii) Both Se and Zn are closely associated between them and with ALB (and in a lesser extend with GLU) in all the groups, which possibly indicates a role of these parameters in acute phase reactions.

And (iv) it is also worth to note that our dendrogram analysis clearly show close associations among the biochemical parameters/end points indicate of liver damage (ALKP and ALT), renal function (BUN and CREA), liver function (ALB and GLU), and inflammatory challenge (GLOB; in this case except in the renal patient were GLOB increase possibly indicates a compensatory mechanism of the ALB loose in urine).

Although most of these latent associations between variables revealed by HCA are logical and well defined, the relationships among variables were also studied by applying a second display chemometric technique as verification procedure. In this case, PCA was also performed on the four pathological groups. The results of the association among trace elements and biochemical variables were evaluated through the loading plots of the variables in the space defined by the first three principal components. These loading plots for the four class diseases were presented in Figure 4 (preserving the 74.9%, the 65.0%, 65.1% and 68.1% of the total data variance for hepatic, gastrointestinal, inflammatory-infection and renal classes, respectively). As it can be seen, PCA revealed the same variable associations than the previously detected by HCA. For each of the considered disease, the same variable association was demonstrated by both display chemometric techniques (see associations marked by the same color codes in Figures 3 and 4). Therefore, the concordant result obtained by two different chemometric techniques with diverse mathematical basis reinforces and confirms the results obtained.

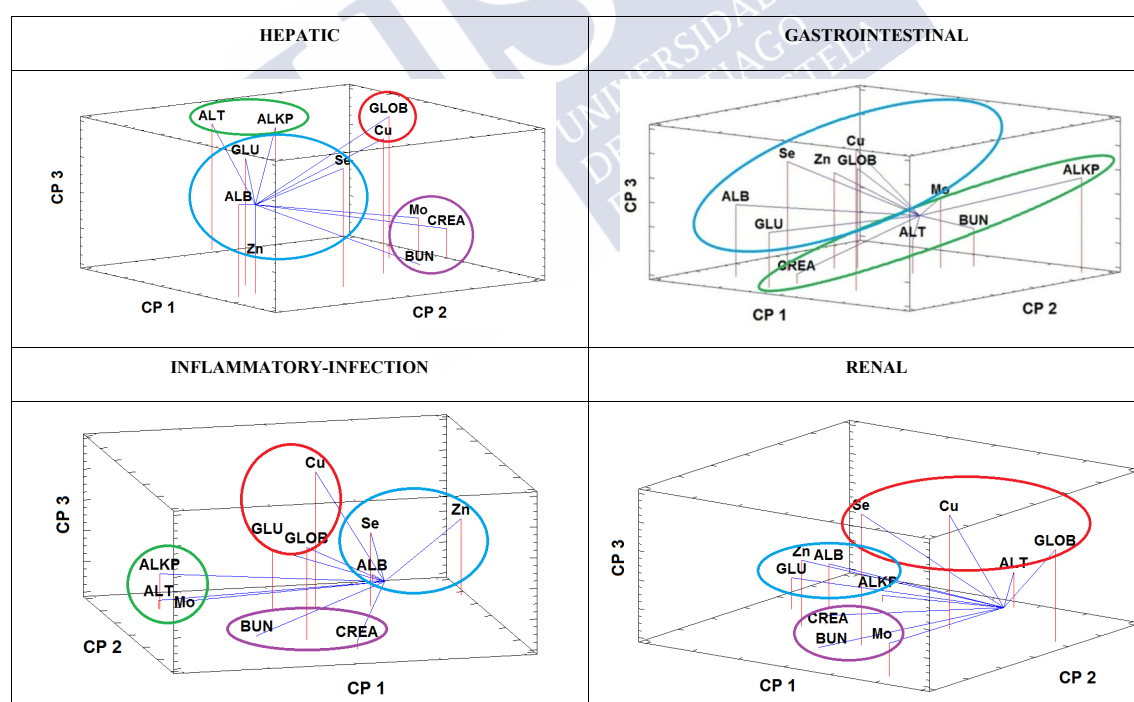


Figure 4. Loading plot of the variables on the space of the first three principal components obtained by PCA for the different groups of pathological dogs affected by hepatic, gastrointestinal, inflammatory-infection and renal diseases, representing 74.9, 65.0, 65.1, and 68.1 % of the total variance, respectively.

4. Discussion

The results of our study in a quite heterogenous cohort/sample of dogs, suffering from a great variety of pathologies at different stages, and in which a quite high experimental noise would be expected, allows us to confirm our previous results [22] that indicate a significant role of trace elements on the pathogenesis of certain diseases and our hypothesis that trace elements in combination/together with other ordinary markers of disease could provide relevant information regarding the diagnosis and prognosis of certain diseases in dogs.

As previously stated, Cu serum concentrations were significantly higher in dogs suffering from hepatic and inflammatory/infection disorders [22]. The results of this study demonstrate that Cu is associated to GLOB in both groups of diseases, which suggest a connection with ceruloplasmin. Ceruloplasmin is an α_2 -glycoprotein which is considered as one of the major positive acute phase proteins in dogs [29]. It plays an important role in protecting host tissues from toxic oxygen metabolites released from phagocytic cells during inflammatory states [30]. Additionally, it is involved in copper transport and antioxidant defense [31], the latter by inhibiting copper ion-stimulated formation of reactive oxidants and the scavengers H₂O₂ and superoxide. Canine serum ceruloplasmin levels increase during infection, inflammation or trauma [18,19,32]. The increase is higher and evident earlier than in humans, peaking at about double normal values on the fourth day following surgery [32]. Measurement of this protein provides valuable information on the inflammatory status to clinicians in canine practice [33] and has been shown to be useful for monitoring the treatment of canine leishmaniasis [29]. If serum Cu is a good indicator of ceruloplasmin it could have a diagnostic value in this type of inflammatory diseases. Moreover, the narrow association between Cu and GLOB with GLU also seems to support the role of Cu during inflammation. It is well known that during infection there is an enhancement in glucose consumption [34,35]. This so-called "stress hyperglycemia" results from release of counter-regulatory hormones (glucagon, cortisol, epinephrine) that oppose the action of insulin. They are released as part of the physiological "stress" response to the infection [36].

In our study Cu (together with Se) was also related with GLOB in the renal group. In dogs, chronic kidney disease is associated with a state of chronic inflammation (even in patients in stable situations) which has been directly related to an increased risk of periodontal and cardiovascular disease [37]. Since blood UREA and CREA only detect a decrease of >75% of renal functional mass, there is a need for markers that allow early detection of renal damage and increase risk of complications [38], and in this sense, changes in serum Cu concentrations in serum (as stated above) could offer valuable information. It is also worth to note that GLOB were related to AST in the renal group. It is well documented that in humans AST serum levels of patients with pre-dialysis chronic kidney disease tended to decrease in proportion to their chronic kidney disease progression, AST serum levels being even lower in patients on hemodialysis [39–42]. Some factors could be implicated in the reduction of AST serum levels among patients with chronic kidney disease on hemodialysis such as lower pyridoxine serum levels, higher homocysteine levels and hemodilution due to fluid retention [43].

In our previous study serum Mo concentrations were significantly higher in animals suffering from renal disorders. These results were expected since Mo has a renal homeostasis mechanism [44] and are in good accordance with the narrow association between Mo and the markers of kidney function BUN and CREA found in the present study in the renal group [22]. Information on Mo concentrations in serum of renal patients is very scarce. In a recent study in dogs and cats with chronic interstitial nephritis was observed that the ratio of Mo excretion in urine was lower than in healthy animals [45]. In humans, it has been suggested that high serum Mo concentrations could contribute to dialysis-related bone disease in patients requiring long term hemodialysis, as massive Mo accumulation causes joint deformity and arthritis [46]. It is worth to know that Mo was also closely related to BUN and UREA in the hepatic patients. Although BUN and CREA are within the adequate range in the hepatic group of dogs, the

association with Mo could indicate an early compromise of the kidney function. Chronic liver disease is associated with primary and secondary kidney disease and impacts markedly on survival; in these patients the evaluation of kidney function and injury relies on the measurement of the concentration of serum creatinine. Note that BUN can be decreased in animals suffering hepatic insufficiency [47] and creatinine is not an early marker of renal disease [48]. Kidney injury biomarkers need further evaluation in the chronic liver disease population, since earlier diagnosis and implementation of currently established beneficial therapies seems to be pivotal in potentially reducing the severity of kidney injury and increasing survival outcomes [49]. Our results indicate that serum Mo when related to BUN and CREA (even within the reference ranges) could give useful information about incipient changes in the kidney and warrants further evaluation. Remarkable is also the close association between ALKP and ALT with Mo in the inflammatory/infection patients displayed by the two chemometric techniques. However, as far we are concerned no information is available in the scientific literature that allows us to discuss the implication of this association.

Last, but not least, is the close association between Se and/or Zn with ALB. Albumin is a key somatic/plasmatic protein with a myriad of important physiologic effects, which is essential in any basic healthy biochemical profile. Quantitative changes in serum albumin concentration represent an important indicator of the presence of disease or its progression or improvement. The significance of serum albumin estimations is limited to varying degrees of hypoalbuminemia, since, except for cases of acute dehydration, hyperalbuminemia does not occur. The serum albumin level depends on the balance between synthesis, catabolism (i.e. endogenous degradation and external loss) and distribution between the intra- and extravascular pool, any of which can singly or in combination be altered in disease. In clinical medicine, hypoalbuminemia is generally not the result of a single mechanism. Causes of hypoalbuminemia include malnutrition, maldigestion and/or malabsorption syndrome, liver failure, protein-losing enteropathy, nephrotic syndrome and, last, but not least, inflammation and infection, where albumin is considered a negative acute phase protein. Acute-phase proteins are a class of proteins whose plasma concentrations increase (positive acute-phase proteins) or decrease (negative acute-phase proteins) in response to inflammation and other acute physiologic processes within the acute phase reactions [50]. In response to injury, local inflammatory cells (neutrophil granulocytes and macrophages) secrete a number of cytokines into the bloodstream, most notable of which are the interleukins IL1, and IL6, and TNF α . The physiological role of decreased synthesis of albumin and other negative acute phase proteins, as selenoprotein P, is generally to save amino acids for producing "positive" acute-phase proteins more efficiently.

Together with negative acute phase proteins, some circulating trace elements such as Zn and Se are known to significantly decrease during the acute phase reaction [50]. Renko et al. [51] have shown that hepatic Se metabolism becomes progressively disturbed during the acute phase reaction negatively affecting serum Se status by insufficient biosynthesis of the central Se transport and storage protein selenoprotein P; as a result, regular Se metabolism and Se transport is severely interrupted. Moreover, the hypoxia associated to severe diseases has also been associated with a general decline of selenoprotein P expression [52] and thereby decreased selenium export from hepatocytes. By other hand, the decrease of zinc serum levels observed during acute phase reactions seems to be associated, to the decreased hepatocytic secretion of albumin, since it is the main transporting zinc within the blood stream, however it is also possible that are downregulated the Zip-14 transporter [53] and the metallothionein synthesis by pro-inflammatory cytokines on the liver [54] that are key molecules on the intracellular metal ion binding capacity, could also causes decreased serum zinc values [50]. Decrease of Se and Zn concentrations in these patients is very relevant since both elements are cofactors of essential enzymes: Selenium is essential for the catalytic activity of glutathione peroxidase protecting against membrane lipid peroxidation, while Zn also combats oxidative stress as cofactors in zinc superoxide dismutase [55]. With such roles, adequate trace element status is of particular

importance in critically ill patients. Some authors propose that this reduction may deplete circulating antioxidants leading to an elevation of ROS thereby exacerbating the severity of illness [52,56]. For this reason, monitoring the levels of Se and Zn in serum, together with albumin (negative acute phase protein) and protein C reactive (positive acute phase protein) could offer a valuable information when evaluating critical patients.

5. Conclusions

The results of our study, in a cohort of dogs that represents/covers a great variety of pathological disorders, clearly indicates that trace elements have a great role during the disease, particularly in relation to acute phase reactions: serum Cu as subrogate/indirect measurement of ceruloplasmin (positive acute phase protein), serum Se and Zn as negative acute phase reactants. Molybdenum could also be a suitable marker of incipient renal disease. Considering that nowadays the determination of trace element concentrations (by using the multielement technique ICP-MS) is a cheap and easy technique available in numerous diagnosis laboratories, the determination of the trace element profile in serum would allow not only to support the diagnosis made with other markers, but also to do a better prognosis of the risk associated (in example, Se and Zn could be indirect measures of the antioxidative potential represented by glutathione peroxidase and superoxide dismutase). Since trace elements deficiencies are associated with increased risk of morbidity and mortality, future research should be directed towards investigating the potential benefits of antioxidant trace elements supplementation in patients suffering from severe disease.

Acknowledgments: The authors thank Rof-Codina Veterinary Teaching Hospital and RIAIDT-USC, University of Santiago de Compostela, for the use of clinical and analytical facilities.

Author Contributions: Conceptualization, Yolanda Cedeño, Marta Miranda and Marta López-Alonso; Resources, Yolanda Cedeño, Inmaculada Orjales, Maruska Suárez and Diego Luna; Investigation, Yolanda Cedeño, Marta Miranda, Inmaculada Orjales, Maruska Suárez and Marta López-Alonso; Methodology, Yolanda Cedeño, Inmaculada Orjales Data curation and Software, Carlos Herrero-Latorre and Marta López-Alonso; Formal analysis, Yolanda Cedeño, Marta Miranda, and Marta López-Alonso; Supervision, Marta Miranda and Marta López-Alonso; Writing – original draft, Yolanda Cedeño, Marta Miranda, Carlos Herrero-Latorre and Marta López-Alonso; Writing – review & editing, Yolanda Cedeño, Marta Miranda and Marta López-Alonso.

Funding : No funding

Conflicts of Interest : The authors declare no potential conflicts of interest concerning the research, authorship or publication of this article.

References

1. Prashanth, L.; Kattapagari, K.K.; Chitturi, R.T.; Baddam, V.R.R.; Prasad, L.K. A review on role of essential trace elements in health and disease. *J. dr. ntr Univ. Heal. Sci.* **2015**, *4*, 75.
2. World Health Organization *Trace elements in human nutrition and health*; World Health Organization, 1996; ISBN 9241561734.
3. Mertz, W. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition: Volume 2*; Elsevier, 2012; Vol. 2; ISBN 0080924697.
4. Officials, A. of A.F.C. AAFCO Dog and Cat Food Nutrient Profiles 2014.
5. Tulchinsky, T.H. Micronutrient deficiency conditions: global health issues. *Public Health Rev.* **2010**, *32*, 243–255.
6. World Health Organization *The world health report 2000: health systems: improving performance*; World Health Organization: Geneva, 2000; ISBN 924156198X.
7. Diana, A.; Haszard, J.J.; Purnamasari, D.M.; Nurulazmi, I.; Luftimas, D.E.; Rahmania, S.; Nugraha, G.I.; Erhardt, J.; Gibson, R.S.; Houghton, L. Iron, zinc, vitamin A and selenium status in a cohort of Indonesian infants after adjusting for inflammation using several different approaches. *Br. J. Nutr.*

- 2017, 118, 830–839.
8. MacDonell, S.O.; Miller, J.C.; Harper, M.J.; Reid, M.R.; Haszard, J.J.; Gibson, R.S.; Houghton, L.A. A comparison of methods for adjusting biomarkers of iron, zinc, and selenium status for the effect of inflammation in an older population: A case for interleukin 6. *Am. J. Clin. Nutr.* **2018**, *107*, 932–940.
9. Mcmillan, D.C. Relationship between nutritional status and the systemic inflammatory response: Micronutrients Conference on 'Nutrient–nutrient interaction' Symposium 2: Nutrient interactions and their role in protection from chronic diseases Relationship between n. **2018**.
10. Ruocco, M.A.C.; Cechinatti, E.D.P.; Barbosa Jr, F.; Navarro, A.M. Zinc and selenium status in critically ill patients according to severity stratification. *Nutrition* **2018**, *45*, 85–89.
11. de Almeida, A.A.; Gajewska, K.; Duro, M.C.F.; da Costa, F. do A.F.; Pinto, E.A.C. Trace element imbalances in patients undergoing chronic hemodialysis therapy—report of an observational study in a cohort of Portuguese patients. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2020**, 126580.
12. Braunstein, M.; Kusmenkov, T.; Zuck, C.; Angstwurm, M.; Becker, N.-P.; Böcker, W.; Schomburg, L.; Bogner-Flatz, V. Selenium and selenoprotein P deficiency correlates with complications and adverse outcome after major trauma. *Shock* **2020**, *53*, 63.
13. Chasapis, C.T.; Ntoupa, P.-S.A.; Spiliopoulou, C.A.; Stefanidou, M.E. Recent aspects of the effects of zinc on human health. *Arch. Toxicol.* **2020**, 1–18.
14. Zemrani, B.; Bines, J.E. Recent insights into trace element deficiencies: causes, recognition and correction. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2020**, *36*, 110–117.
15. McMillan, D.C.; Maguire, D.; Talwar, D. Symposium 2: Nutrient interactions and their role in protection from chronic diseases: Relationship between nutritional status and the systemic inflammatory response: Micronutrients. *Proc. Nutr. Soc.* **2019**, *78*, 56–67.
16. Panda, D.; Patra, R.C.; Nandi, S.; Swarup, D. Oxidative stress indices in gastroenteritis in dogs with canine parvoviral infection. *Res. Vet. Sci.* **2009**, *86*, 36–42.
17. Pilarczyk, B.; Tomza-Marciniak, A.; Pilarczyk, R.; Bakowska, M.; Gaik, M.; Wilk, M.; Kuba, J. Relationship between serum Se concentration in dogs and incidence of some disease conditions. *Cent. Eur. J. Biol.* **2013**, *8*, 527–533.
18. Seyrek, K.; Karagenc, T.; Paşa, S.; Kiral, F.; Atasoy, A. Serum Zinc, Iron and Copper Concentrations in Dogs Infected with Hepatozoon canis. *Acta Vet. Brno* **2009**, *78*, 471–475.
19. Da Silva, A.S.; França, R.T.; Costa, M.M.; Paim, C.B. V.; Paim, F.C.; Santos, C.M.M.; Flores, E.M.M.; Eilers, T.L.; Mazzanti, C.M.; Monteiro, S.G.; et al. Influence of Rangelia vitalii (Apicomplexa: Piroplasmorida) on Copper, Iron, and Zinc Bloodstream Levels in Experimentally Infected Dogs. *J. Parasitol.* **2012**, *98*, 1018–1020.
20. Kilpatrick, S.; Jacinto, A.; Foale, R.D.; Tappin, S.W.; Burton, C.; Frowde, P.E.; Elwood, C.M.; Powell, R.; Duncan, A.; Mellanby, R.J. Whole blood manganese concentrations in dogs with primary hepatitis. *J. Small Anim. Pract.* **2014**, *55*, 241–246.
21. Vitale, S.; Hague, D.W.; Foss, K.; de Godoy, M.C.; Selmic, L.E. Comparison of Serum Trace Nutrient Concentrations in Epileptics Compared to Healthy Dogs. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 1–8.
22. Cedeño, Y.; Miranda, M.; Orjales, I.; Herrero-Latorre, C.; Suárez, M.; Luna, D.; López-Alonso, M. Serum Concentrations of Essential Trace and Toxic Elements in Healthy and Disease-Affected Dogs. *Animals* **2020**, *10*, 1052.
23. Parliament, E. DIRECTIVE 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *B. Dir. 2010/63/EU Eur. Parliam. Counc. 22 Sept. 2010 Prot. Anim. used Sci. Purp. City* **2010**, 33–78.
24. BOE, B.O. del E. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *BOE* **2013**, *34*, 11370–11421.
25. Boes, K.M.; Sink, C.A.; Camus, M.S.; Werre, S.R. Evaluation of an in-clinic dry chemistry analyzer for canine, equine, and feline plasma samples. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **2018**, *30*, 902–910.
26. Massart, D.L.; Kaufman, L. Hierarchical clustering methods. *Interpret. Anal. Chem. data by use Clust. Anal.* **1983**, 75–99.
27. Jolliffe, I.T. Principal components in regression analysis. In *Principal component analysis*; Springer Series in Statistics: New York, NY, 1986; pp. 129–155.
28. Massart, D.L. Chemometrics: a textbook. *Data Handl. Sci. Technol.* **1988**, *2*, 53.
29. Martínez-Subiela, S.; Bernal, L.J.; Cerón, J.J. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *Am. J. Vet. Res.* **2003**, *64*, 1021–1026.
30. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease:

- an overview. In *Methods in enzymology*; Elsevier, 1990; Vol. 186, pp. 1–85 ISBN 0076-6879.
31. Samokyszyn, V.M.; Miller, D.M.; Reif, D.W.; Aust, S.D. Inhibition of superoxide and ferritin-dependent lipid peroxidation by ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21–26.
 32. Conner, J.G.; Eckersall, P.D.; Ferguson, J.; Douglas, T.A. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Res. Vet. Sci.* **1988**, *45*, 107–110.
 33. Solter, P.F.; Hoffmann, W.E.; Hungerford, L.L.; Siegel, J.P.; St Denis, S.H.; Dorner, J.L. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **1991**, *52*, 1738.
 34. Ojcius, D.M.; Degani, H.; Mispelter, J.; Dautry-Varsat, A. Enhancement of ATP levels and glucose metabolism during an infection by Chlamydia NMR studies of living cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7052–7058.
 35. Raghunand, N.; Dale, B.E. Alteration of glucose consumption kinetics with progression of baculovirus infection in *Spodoptera frugiperda* cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *80*, 231–242.
 36. Marik, P.E.; Raghavan, M. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care Med.* **2004**, *30*, 748–756.
 37. Glickman, L.T.; Glickman, N.W.; Moore, G.E.; Lund, E.M.; Lantz, G.C.; Pressler, B.M. Association between chronic azotemic kidney disease and the severity of periodontal disease in dogs. *Prev. Vet. Med.* **2011**, *99*, 193–200.
 38. Smets, P.M.Y.; Meyer, E.; Maddens, B.E.J.; Duchateau, L.; Daminet, S. Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease. *J. Vet. Intern. Med.* **2010**, *24*, 65–72.
 39. CHIMATA, M.; MASAOA, H.; FUJIMAKI, M.; HAMADA, N.; ODA, K.; SUDO, M.; NAGASE, M. Low serum aminotransferase activity in patients undergoing regular hemodialysis. *Japanese J. Nephrol.* **1994**, *36*, 389–395.
 40. Fabrizi, F.; Lunghi, G.; Finazzi, S.; Colucci, P.; Pagano, A.; Ponticelli, C.; Locatelli, F. Decreased serum aminotransferase activity in patients with chronic renal failure: impact on the detection of viral hepatitis. *Am. J. kidney Dis.* **2001**, *38*, 1009–1015.
 41. Sette, L.H.B.C.; Lopes, E.P. de A. The reduction of serum aminotransferase levels is proportional to the decline of the glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease. *Clinics* **2015**, *70*, 346–349.
 42. Abdallah, O.B.; Younis, M.Y.G.; Alammari, J.A.; Abdelmalek, F. Evaluation of hepatic enzymes in Libyan chronic kidney disease patients: need for lower standard "normal" range. *EPH-International J. Appl. Sci. (ISSN 2208-2182)* **2019**, *1*, 751–761.
 43. Huang, J.-W.; Yen, C.-J.; Pai, M.-F.; Wu, K.-D.; Tsai, T.-J.; Hsieh, B.-S. Association between serum aspartate transaminase and homocysteine levels in hemodialysis patients. *Am. J. kidney Dis.* **2002**, *40*, 1195–1201.
 44. Johnson, J.L. Molybdenum. In *Handbook of nutritionally essential mineral elements*; O'Dell, B. L., & Sunde, R.A., Ed.; CRC Press, 1997; pp. 413–438 ISBN 1482273101.
 45. Alborough, R.; Grau-Roma, L.; de Brot, S.; Hantke, G.; Vazquez, S.; Gardner, D.S. Renal accumulation of prooxidant mineral elements and CKD in domestic cats. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3160.
 46. Manuti, J.K.; Al-Rubaye, F.G.; Khudhair, M.S. Serum Concentration of Molybdenum in Chronic Renal Failure Patients Requiring Hemodialysis. *J. Fac. Med. Baghdad* **2011**, *53*, 393–395.
 47. Stockham, S.L.; Scott, M.A. Fundamentals of veterinary clinical pathology. Ames. *Iowa State Univ. Press* **2002**, *52*, 434–459.
 48. Parikh, C.R.; Abraham, E.; Ancukiewicz, M.; Edelstein, C.L. Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2005**, *16*, 3046–3052.
 49. Slack, A.; Yeoman, A.; Wendon, J. Renal dysfunction in chronic liver disease. *Crit. care* **2010**, *14*, 214.
 50. Gruys, E.; Toussaint, M.J.M.; Niewold, T.A.; Koopmans, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2005**, *6*, 1045.
 51. Renko, K.; Hofmann, P.J.; Stoedter, M.; Hollenbach, B.; Behrends, T.; Köhrle, J.; Schweizer, U.; Schomburg, L. Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice. *FASEB J.* **2009**, *23*, 1758–1765.
 52. Becker, N.-P.; Martitz, J.; Renko, K.; Stoedter, M.; Hybsier, S.; Cramer, T.; Schomburg, L. Hypoxia reduces and redirects selenoprotein biosynthesis. *Metallomics* **2014**, *6*, 1079–1086.
 53. Mohammad, M.K.; Zhou, Z.; Cave, M.; Barve, A.; McClain, C.J. Zinc and liver disease. *Nutr. Clin. Pract.* **2012**, *27*, 8–20.
 54. DiSilvestro, R.A.; Carlson, G.P. Inflammation, an inducer of metallothionein, inhibits carbon-tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol. Lett.* **1992**, *60*, 175–181.

- 549 55. Michiels, C.; Raes, M.; Toussaint, O.; Remacle, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase,
550 and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *17*, 235–248.
551 56. Rinaldi, S.; Landucci, F.; De Gaudio, A.R. Antioxidant therapy in critically septic patients. *Curr. Drug*
552 *Targets* **2009**, *10*, 872–880.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





Publicación 3

Cedeño Y, López-Alonso M, Miranda M. 2016. Hepatic concentrations of copper and other metals in dogs with and without chronic hepatitis. *Journal of Small Animal Practice*. 57(12): 703-709. DOI: 10.1111/jsap.12591

Hepatic concentrations of copper and other metals in dogs with and without chronic hepatitis

Y. CEDEÑO*, M. LÓPEZ-ALONSO† AND M. MIRANDA‡,1

*Department of Animal Pathology, Veterinary Faculty, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, 27002, Spain

†Faculty of Veterinary Medicine, Universidad Central del Ecuador, Quito, 170129, Ecuador

‡Department of Anatomy, Animal Production and Clinical Veterinary Sciences, Veterinary Faculty, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo 27002, Spain

¹Corresponding author email: marta.miranda@usc.es

OBJECTIVES: Defects in copper metabolism have been described in several dog breeds, and recently, it has been suggested that changes in other essential trace elements could be involved in the pathogenesis of hepatic disease. This study measured hepatic copper accumulation and its interactions with other essential trace and toxic metals in dogs diagnosed with chronic hepatitis.

METHODS: Liver samples of 20 chronic hepatitis and 20 healthy dogs were collected. Samples were acid digested, and essential metals (cobalt, copper, iron, manganese, molybdenum, selenium and zinc) and toxic metals (arsenic, cadmium, mercury and lead) were analysed by inductively-coupled plasma mass spectrometry.

RESULTS: Copper concentrations were significantly higher in dogs affected by hepatic disease than in controls. Dogs having chronic hepatitis with liver copper concentration greater than 100 mg/kg wet weight showed statistically higher cobalt, manganese and zinc concentrations than dogs having chronic hepatitis with liver copper concentrations less than 100 mg/kg wet weight and controls. Toxic metal concentrations were low – in all cases below the threshold associated with toxicity in dogs.

CLINICAL SIGNIFICANCE: Dogs with chronic hepatitis not only have increased concentrations of copper in the liver but also increased concentrations of cobalt, manganese and zinc; measurement of these elements may perhaps aid in diagnosis of liver disease in dogs.

Journal of Small Animal Practice (2016) **57**, 703–709

DOI: 10.1111/jsap.12591

Accepted: 28 July 2016; Published online: 16 October 2016

INTRODUCTION

Copper (Cu) is an essential element involved in many metabolic processes but, in excess, can become extremely toxic. This is because, at concentrations above physiological needs, the capacity of the liver to bind Cu to metallothioneins (MT) is overloaded. The Cu remains free in the cytosol causing dramatic oxidative damage and cellular death (Mercer 2001).

Within the domestic animals, sheep are the most susceptible species to Cu toxicity due to their low capacity for MT synthesis (Howell & Gooneratne 1987). Nevertheless, episodes of Cu tox-

icity have been described in many other species, including dogs, in which hepatic Cu accumulation is associated with numerous episodes of hepatitis, also known as copper-associated chronic hepatitis (CACH). CACH was first identified in Bedlington terriers as an inherited autosomal recessive defect of the COMMD1 gene, which results in reduced biliary excretion of Cu because of hepatic MT sequestration of the metal in hepatic lysosomes (Van De Sluis *et al.* 2002). During the last decade, an increasing number of pure-breed dogs including Doberman pinscher (Mandigers *et al.* 2004), West Highland white terrier (Thornburg *et al.* 1986), Skye terrier (Haywood *et al.* 1988), Dalmatian (Webb *et al.* 2002), most recently the Labrador retriever (Hoffmann

et al. 2006, Smedley *et al.* 2009, Johnston *et al.* 2013) and other pure-breed dogs (Rifkin & Miller 2014), as well as mixed-breed dogs have been associated with CACH (Watson 2004). For most of these breeds, the pathological mechanisms involved are not well understood. Abnormal hepatic Cu accumulation may be the result of either a primary metabolic defect in Cu metabolism or a secondary event from abnormal hepatic function altering biliary Cu excretion. In primary defects, Cu accumulation is always localised centrilobularly (zone 3). In contrast, in secondary processes Cu is mainly restricted to the periportal parenchyma (zone 1) (Watson 2004, Hoffmann *et al.* 2006, Johnston *et al.* 2013, Kilpatrick *et al.* 2014).

It has been suggested that changes in other essential trace elements could be involved in the pathogenesis of hepatic disease (Webb & Twedt 2008). In addition to Cu, many affected CACH dogs had increased iron (Fe) (Smedley *et al.* 2009) and/or zinc (Zn) concentrations (Schultheiss *et al.* 2002, Pressler *et al.* 2010) although concurrent deficient hepatic Zn can also be observed (Rothuizen & Twedt 2009). Very recently, abnormally high cobalt (Co) (Pressler *et al.* 2010) and manganese (Mn) blood concentrations have been described in dogs affected by primary hepatitis, which could have a relevance in the development of hepatic encephalopathy in these animals (Kilpatrick *et al.* 2014). Moreover, the chemical similarity of Cu and other toxic metals to induce and bind to MT (as occurred in environmentally naturally exposed animals; López-Alonso *et al.* 2002) could also contribute to the pathogenesis of the disease.

This initial descriptive study was conducted to evaluate hepatic Cu accumulation and its interactions with other essential trace [Co, Fe, Mn, molybdenum (Mo), selenium, (Se) and Zn] and toxic metals [arsenic (As), cadmium (Cd), mercury (Hg) and lead (Pb)] in dogs with and without chronic hepatitis (CH).

MATERIALS AND METHODS

Study population

Liver samples of dogs affected by CH were collected during post-mortem examination. Twenty samples were considered eligible for inclusion in the study after histopathological confirmation when world small animal veterinary association (WSAVA) criteria were fulfilled (Rothuizen *et al.* 2006). Of these dogs, eight died or were euthanased in an advanced stage of CH; seven had been clinically diagnosed with CH (based on laboratory findings and image) but died/were euthanased for other reasons and in the remaining five dogs CH was a post-mortem finding. None of the dogs received a special liver diet restricted in Cu or was treated with Zn or a chelating agent. Samples of 20 healthy livers (histopathologically confirmed) from animals not affected by metabolic diseases were used as controls. Number of dogs per group was decided taking into account the inter-animal variability in trace element concentrations in the liver and availability of dogs for sampling. Reasons for death or euthanasia of the control dogs were trauma, focal neoplasia, rodenticide exposure, etc. Information on age, gender, breed and other data related to the health register of the animals was obtained from the clinical history. The group of dogs with CH (n = 20) com-

prised of: Doberman pinscher (3), German shepherd (3), English cocker spaniel (2), boxer (1), bull terrier (1), Siberian husky (1), poodle (1) and crossbreeds (8). These comprised 12 females and 8 males, with a mean age 88 months, and a range between 6 and 214 months. The control group (C) were: German shepherd (4), boxer (2), mastiff (2), Pekingese (2), Belgian shepherd (1), English cocker spaniel (1), Siberian husky (1), bloodhound (1), Yorkshire terrier (1) and crossbreeds (5). These comprised 12 females and 8 males with a mean age of 113 months, and a range from 26 to 201 months.

Sample collection and chemical analysis

Three deep tissue samples of approximately 2 cm × 2 cm × 2 cm were collected from the left lateral liver lobe in order to simulate sample collection during percutaneous ultrasound-guided needle biopsy (Rothuizen *et al.* 2006). All samples were taken from near the centre of the lobe. Liver lesions were avoided. One sample was fixed in neutral-buffered 10% formalin at room temperature for histopathology exam. All samples had a minimum of eight portal triads. The other two samples were packed into plastic bags and stored at -20°C for mineral analysis. Approximately 1 g subsamples were digested in 3 mL of concentrated nitric acid and 1 mL 30% w/v hydrogen peroxide in a microwave digestion system (Milestone; Ethos Plus). Digested samples were transferred to polypropylene sample tubes and diluted to 15 mL with ultra-pure water. The concentrations of essential trace elements (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se and Zn) and toxic elements (As, Cd, Hg and Pb) were determined by inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; VGELEMENTAL PlasmaQuad SOption).

An analytical quality control programme was employed during the study. Blank absorbance values were monitored throughout the survey and were subtracted from the readings before the results were calculated. The limits of detection (LoD) were calculated as three times the standard deviation of the reagent blanks (Table 1). All samples were above LoD. Analytical recoveries were determined from a certified reference material analysed together with the samples (Standard Reference Material® 1577c Bovine Liver; National Institute of Standards & Technology). There was good agreement between the measured and the certified values (Table 1). The precision of the

Table 1. Analytical quality programme expressed as mean ± standard deviation used in the determination of essential trace and toxic elements

	Detection limit (µg/L)	SRM 1577c	
		Certified levels (mg/kg)	Analysed levels (mg/kg)
As	0.3	0.0196±0.0014	0.0201±0.0007
Cd	0.1	0.0970±0.0014	0.1059±0.0038
Co	0.2	0.300±0.018	0.318±0.006
Cu	3.1	275.2±4.6	273.1±11.1
Fe	12	197.94±0.65	198.02±4.58
Hg	0.2	–	0.141±0.012
Mn	1.2	10.46±0.47	10.48±0.12
Mo	1.2	3.30±0.13	3.33±0.31
Pb	0.9	0.0628±0.0001	0.0599±0.0041
Se	1.2	2.031±0.045	1.989±0.047
Zn	15	181.1±1.0	180.4±1.7

As arsenic, Cd cadmium, Co cobalt, Cu, copper, Fe iron, Hg mercury, Mn manganese, Mo molybdenum, Pb lead, Se selenium, Zn zinc

analytical method was evaluated by measuring the absorbance signals in the same digested sample 12 times. To assess the precision of the overall procedure, readings of 12 different digested aliquots were performed. Intra- and inter-assay coefficients of variation were between 1.48 to 4.72 and 3.11 to 10.7%, respectively.

Data were presented in mg/kg wet weight (wt.w.). The dry matter content of the liver (calculated by drying 10 different sub-samples at 80° until reaching a constant weight) was 24.9 ± 3.1 and did not differ between control and affected dogs. Liver tissue Cu concentrations less than 100 mg/kg wt.w. (<400 mg/kg d.w.) were considered physiologically normal (Thornburg 2000, Webb *et al.* 2002, Hoffmann *et al.* 2006, Johnston *et al.* 2013).

Data analysis

All statistical analyses were carried out using SPSS for Windows (v. 20.0). Graphics were performed with InvivoStat Graphics. Normal distribution of data sets was checked using the Kolmogorov–Smirnov test. As and Cd concentrations did not follow a normal distribution and so data on toxic elements are given as median and range and differences between groups were tested by non-parametric tests. Differences between Cu concentrations in dogs affected by CH and controls were checked using a t-test. Differences in hepatic concentrations of trace and toxic element in dogs affected by CH, both associated or not to Cu accumulation, and controls were evaluated using a one-way analysis of variance and post hoc honest significant difference Tukey tests. Correlations between Cu and essential trace and toxic element concentrations were tested by Pearson's correlation analysis with Bonferroni correction, considering significance when $P < 0.005$.

RESULTS

Figure 1 shows hepatic Cu concentrations in CH and C groups. Cu concentrations were significantly higher ($P < 0.001$) in dogs

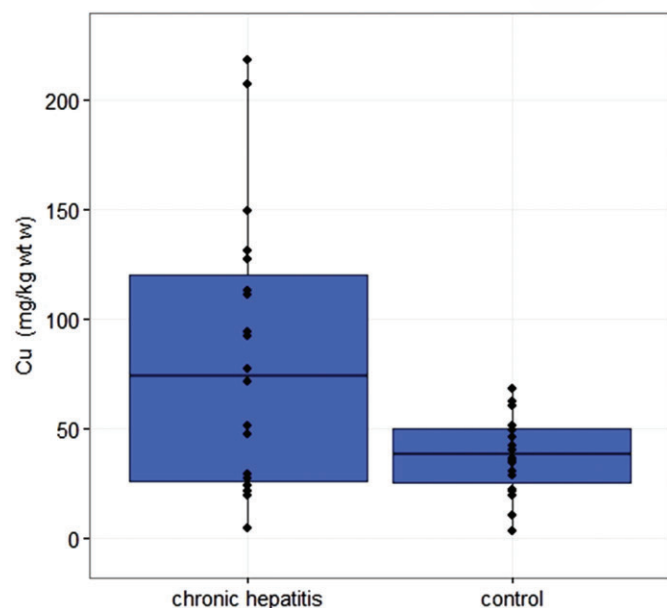


FIG 1. Hepatic copper concentrations (mg/kg wet weight (wt.w.)) in chronic hepatitis and control groups

affected by hepatic disease compared with the controls. In the CH group, Cu concentrations ranged from 4 to 218 mg/kg wt.w. (median 74 mg/kg); seven dogs showed Cu levels above the normal range (<100 mg/kg wt.w.); these were five females and two males, three were of known susceptible breeds (two Doberman pinschers, one poodle), one German shepherd and three cross-breeds. Within the control group, Cu concentration was 38 mg/kg (median), ranging from 3 to 68 mg/kg; none had Cu above the normal range.

Three categories were identified based on the hepatic Cu content: dogs having CH with liver Cu greater than 100 mg/kg wt.w. (CH-Cu >100); dogs having CH with liver Cu less than 100 mg/kg wt.w. (CH-Cu <100) and control dogs (C). Hepatic Co, Fe, Mn, Mo, Se and Zn concentrations in dogs of the three groups, CH-Cu greater than 100 ($n=7$), CH-Cu less than 100 ($n=13$), and control ($n=20$) dogs, are presented in Fig 2. Dogs with the higher Cu concentration (CH-Cu >100) showed statistically higher Co (33.3), Mn (2.95) and Zn (67.3) concentrations ($P < 0.001$) than those with lower concentrations (CH-Cu <100) and controls – these latter groups did not differ from each other (Co: 10.1 and 12.9; Mn: 2.15 and 2.19; Zn: 43.7 and 43.6, respectively). A similar pattern (although without any statistically significant difference) was found for Fe and Mo (CH-Cu >100 had more of these elements than CH-Cu <100 , which had more than the controls), whereas for Se similar concentrations were found for all three groups.

Statistically significant associations between Cu and Co, Mn and Zn concentrations in the liver are presented in Fig 3. When considering all animals included in this study, the Cu concentrations were positively correlated with other elements as follows: Co: $r=0.542$, $P < 0.001$; Mn: $r=0.715$, $P < 0.001$ and Zn: $r=0.546$, $P < 0.001$. However, when the analysis was restricted to the CH-Cu greater than 100 group, associations were stronger (in spite of the low number of samples) and showed a steeper correlational slope: Co: $r=0.882$, $P < 0.005$; Mn: $r=0.916$, $P < 0.005$ and Zn: $r=0.819$, $P < 0.005$.

Hepatic toxic metal concentrations in CH-Cu greater than 100, CH-Cu less than 100 and C dogs are presented in Table 2. Toxic metal concentrations were low; in all animals below the threshold associated with toxicity in dogs according to Puls (1994).

DISCUSSION

Despite the small sample size, our results indicate that the profile of dogs affected by CH is similar to that in other recent studies (Poldervaart *et al.* 2009, Bexfield *et al.* 2012, Kilpatrick *et al.* 2014). The dogs we diagnosed with CH support the assumption of a higher prevalence of CH in certain breeds, including the Doberman pinscher, American and English cocker spaniels and poodles. Forty per cent (8 of 20) of affected dogs in our study were crossbreeds. Although it is documented that cross-breeds can be affected by CH (Thornburg *et al.* 1990, Rothuizen & Twedt 2009), little information is available in the literature making comparisons difficult: cross-breed dogs represent a very

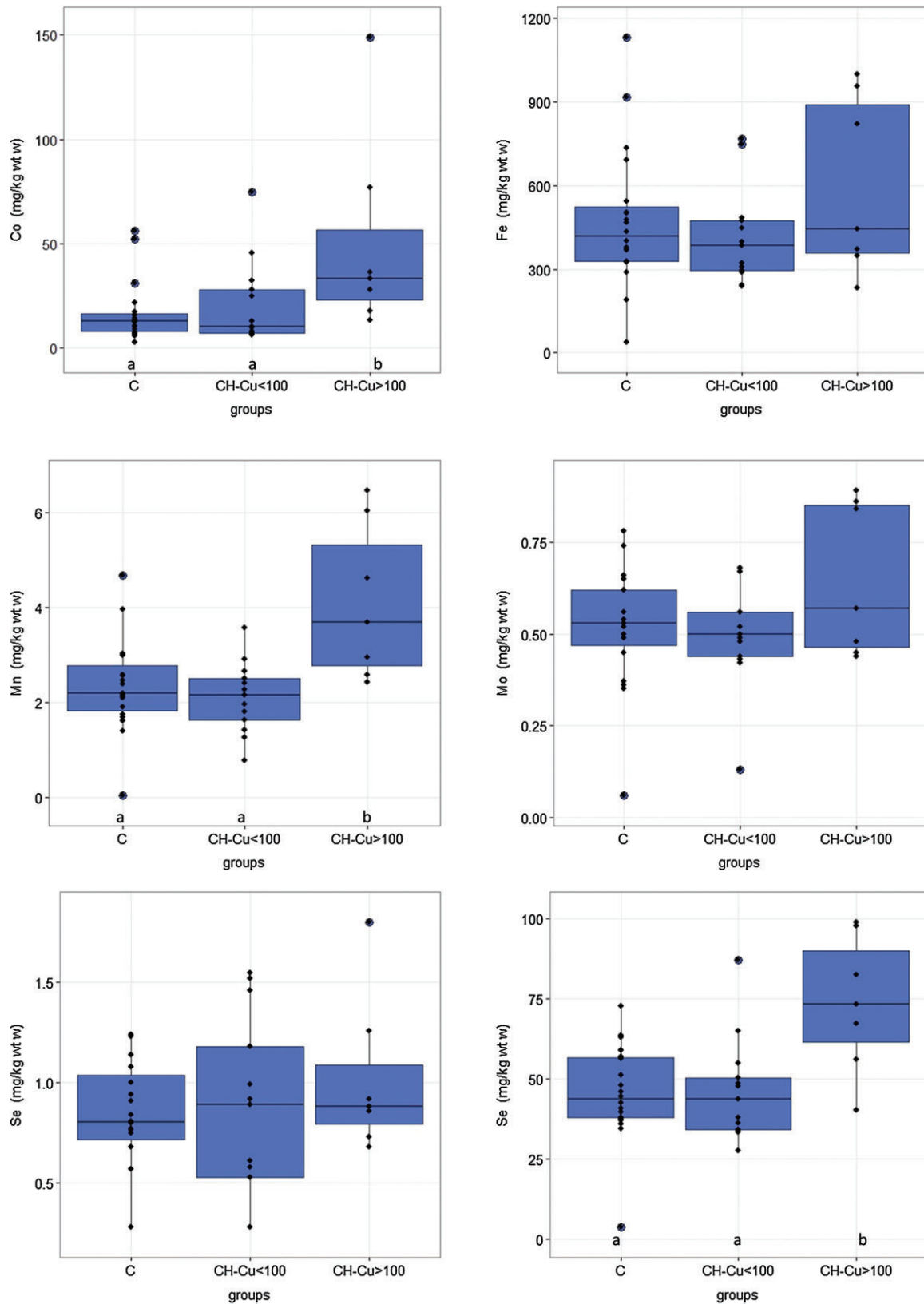


FIG 2. Dotplots showing Co, Fe, Mn, Mo, Se and Zn hepatic concentrations in dogs with chronic hepatitis with liver Cu greater than 100mg/kg wt.w. (CH-Cu>100, n=7), chronic hepatitis with liver Cu less than 100mg/kg wt.w. (CH-Cu<100, n=13) and control group (C, n=20). Different letters indicate statistically significant differences between groups (P<0.001)

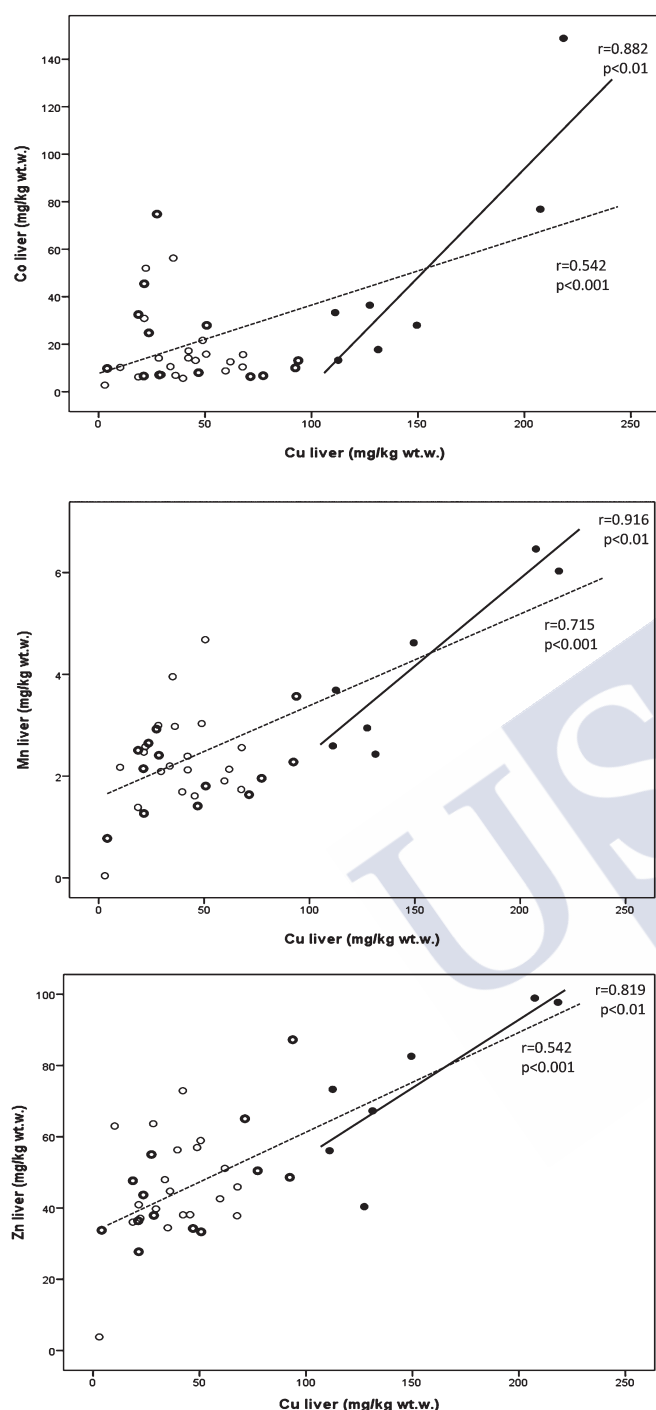


FIG 3. Relationship between liver Cu concentrations (mg/kg wt.w.) and liver Co, Mn and Zn concentrations (mg/kg wt.w.). Discontinuous line (---) all animals (•: chronic hepatitis with liver Cu>100 mg/kg (CH-Cu>100, n=7); o: chronic hepatitis with liver Cu less than 100 mg/kg (CH-Cu<100, n=13); o: control (C, n=20). Continuous line (—) animals with chronic hepatitis with liver Cu greater than 100 mg/kg (CH-Cu>100, n=7)

heterogeneous group, clearly different in number and breed-mixtures in the different countries and possibly with different access to veterinary services compared to pure-breed dogs. Although there are differences by breeds, females are generally more affected than males (Watson 2004, Bexfield *et al.* 2012) and median age at diagnosis is around 6 to 8 years (with a range from 5 months to

Table 2. Toxic metal concentrations (µg/kg wet weight) in the liver of dogs with chronic hepatitis with liver Cu greater than 100 mg/kg wt.w. (CH-Cu>100, n=7), chronic hepatitis with liver Cu less than 100 mg/kg wt.w. (CH-Cu<100, n=13) and control (C, n=20) dogs

	CH-Cu>100		CH-Cu<100		C	
	Median	Range	Median	Range	Median	Range
As	9.8	7.5 to 16.4	8.9	3.7 to 92.0	10.1	6.7 to 41.8
Cd	122	38 to 195	54	16 to 336	70	7 to 606
Hg	42.9	6.8 to 214.9	70.4	3.4 to 146.4	31.2	3.4 to 207.1
Pb	90	28 to 245	49	15 to 163	54	11 to 253

As arsenic, Cd cadmium, Hg mercury, Pb lead.

18 years) (Poldervaart *et al.* 2009, Bexfield *et al.* 2012, Kilpatrick *et al.* 2014, Rifkin & Miller 2014).

Seven of the 20 dogs (35%) affected by CH in our study showed a hepatic Cu accumulation above the normal range (<100 mg/kg) (Thornburg 2000, Webb *et al.* 2002, Hoffmann *et al.* 2006, Johnston *et al.* 2013). Not much information is available, but our data is in accordance with a recent study in The Netherlands that demonstrated that 36% of cases of primary hepatitis had increased Cu accumulation on rubeanic stained sections of liver tissue (Poldervaart *et al.* 2009). Again, some breeds are clearly related to this pathology. The only well-known genetic disorder is that affecting Bedlington terrier (Van De Sluis *et al.* 2002). In other breeds, primary Cu metabolism disorders are more complex and have not been fully determined. For Labrador retrievers, an inherited genetic defect has also been proposed (Hoffmann *et al.* 2006, Johnston *et al.* 2013). In young Dalmatians, CACH shares some similarities with the Bedlington disease and may represent a primary metabolic defect in hepatic Cu metabolism (Webb *et al.* 2002). In other breeds, CACH appears to be overrepresented, including Doberman pinscher (Mandigers *et al.* 2004), West Highland white terrier (Thornburg *et al.* 1986) and Skye terrier (Haywood *et al.* 1988), but in none of these does it appear to be a true “storage disease” like it is in Bedlington terriers. In contrast to Bedlington terriers, Cu does not build up throughout life and the amount of Cu stored is often not correlated with the degree of underlying disease and/or is not present very early in the disease process (Thornburg 2000). In these breeds, Cu accumulation appears to be secondary to cholestatic liver injury (Rothuizen & Twedt 2009). Cu accumulation should then be understood as cause and effect of CH. In general, susceptibility to accumulation has a genetic basis and the expression of disease is due to environmental factors, such as diet (Johnston *et al.* 2013, Fieten *et al.* 2014). Johnston *et al.* (2013) described an increase of hepatic Cu in dogs over time, reflecting increased ingestion and more bioavailable forms of Cu in the diet.

The impact of primary hepatic disease on the metabolism of other trace elements has been documented in dogs (Schultheiss *et al.* 2002, Smedley *et al.* 2009, Pressler *et al.* 2010). Fe is possibly the element that has received most attention and both Cu and Fe-induced hepatic damage is thought to be the result of free radical-generated oxidant injury (Center 1999). A high proportion of dogs in this study had increased liver iron concentrations (normal range 88 to 438 mg/kg w.wt. or 350 to 1750 mg/

kg d.w., Smedley *et al.* 2009). Hepatic Fe concentrations were not statistically higher in 'CH-Cu greater than 100' compared to 'CH-Cu less than 100' or 'C' dogs, although the CH-Cu greater than 100 group showed the highest proportion of dogs with high hepatic Fe concentrations. In one study using dogs of various breeds, it was found that dogs can have a wide range of hepatic Fe concentrations (Schultheiss *et al.* 2002). Increased hepatic Fe concentrations have been documented in naturally-occurring and experimental canine CH (Schultheiss *et al.* 2002, Fuentealba & Aburto 2003, Soubasis *et al.* 2006, Smedley *et al.* 2009). The pathogenic mechanism of Fe on CH, and particularly in dogs with Cu accumulation, is not completely understood and no consistent associations have been found between both metals (Center 1999). Fe and Cu concentrations do not appear to increase in direct proportion to each other (Schultheiss *et al.* 2002). In contrast to Cu, Fe is not excreted into bile, so Fe concentration would not be expected to influence abnormalities in the biliary system (Center 1999). In the liver of CH-affected dogs, Fe histologically appears adjacent to areas of chronic inflammation within the Kupffer cells which could support the hypothesis of haemolytic disease (Center 1999). In any case, hepatic Fe accumulation in our study appears to be a consequence of the liver disease, but probably not directly the cause of liver lesions (Schultheiss *et al.* 2002).

In contrast to Fe accumulation that could be related to inflammatory and haemolytic processes, the increase and interaction of Cu with other essential metals (Zn, Mn and Co) appears to be secondary to a cholestatic phenomenon. Hepatic Zn concentrations were statistically higher in CH-Cu greater than 100 compared to CH-Cu less than 100 or C dogs, with normal liver Zn concentrations in the three groups (<200 mg/kg w.wt. or 800 mg/kg d.w., Schultheiss *et al.* 2002). The role of Zn on CH is even less well understood. Zn is a relatively low-toxic element and Zn concentrations above physiological levels are uncommon in dogs affected by liver disease (Schultheiss *et al.* 2002), and have not been correlated with Fe and Cu levels or histologic lesions in CH-affected dogs. Moreover, whereas some dogs with CH and Cu accumulation were deficient in hepatic Zn (Webb *et al.* 2002) in others the Zn concentrations were higher than in controls (Schultheiss *et al.* 2002). Inconsistent results between studies could be explained considering the relative concentrations of both metals in the body. It is well known that Cu and Zn share chemical properties and have important metabolic relationships in the healthy animal (López-Alonso *et al.* 2002) because of their capacity to induce and bind to MT. In fact, these common homeostatic mechanisms are the basis of Zn therapy in CH. Zn induces the production of MT in the intestinal mucosa, binding Cu in the intestinal cell and therefore preventing its absorption (Hoffmann *et al.* 2009, Fieten *et al.* 2013). Zn treatment can generate a negative Cu balance and therefore indirectly remove free Cu from the liver (Hoffmann *et al.* 2006, 2009, Fieten *et al.* 2013, 2014). Zn can induce MT in hepatocytes thereby binding free Cu and protecting cells against oxidative stress induced by free Cu.

The increase of Mn concentrations in the liver of CH-Cu greater than 100 dogs in our study could also be explained by

a cholestatic phenomenon, although Gow *et al.* (2015) demonstrated that resolution of congenital portosystemic shunts in dogs resolves the encephalopathy but not the hypermanganesaemia. The liver plays a pivotal role in Mn metabolism because the majority of the gastrointestinal-absorbed element is removed by the liver and excreted into bile, allowing for only approximately 2% of absorbed Mn to reach the systemic circulation (Aschner & Aschner 2005). Very limited information is available on the role of Mn in canine liver disease, even though recent studies have demonstrated that whole-blood Mn concentrations were higher in dogs with primary hepatitis (Kilpatrick *et al.* 2014) and hepatic encephalopathy (Gow *et al.* 2015). Studies in humans have shown increased blood Mn concentrations and deposition in the central nervous system (CNS) in cases of hepatic insufficiency (Zheng *et al.* 2011, Tuschl *et al.* 2013). The deposition of Mn in the CNS is considered to play a role in hepatic encephalopathy and a direct relationship has been demonstrated between blood Mn concentration, Mn deposition in the brain and severity of encephalopathic score in humans (Bowman *et al.* 2011).

Co is a relatively low-toxic element, poorly retained in tissues and scarcely studied in dogs. Although the main route of excretion of Co is via the kidney (Simonsen *et al.* 2012), a small but significant amount is excreted by the bile. Cholestasis could explain the higher concentrations of Co found in the CH-Cu greater than 100 dogs in our study. Pressler *et al.* (2010) suggested that COMMD+/- beagle-Bedlington terriers, although asymptomatic, may have an uncharacterised defect that results in liver Co accumulation. However, since hepatic Co reference values have not yet been established for dogs, we are unable to assess the relevance of the increase of Co concentrations in the CH dogs.

Finally, to point out that we are conscious that the present study has several limitations. This is an initial descriptive study, with a limited number and heterogenous group of animals; there are not reference intervals in dogs for all the metals analysed in this study and the reference ranges for Cu are established on dry tissue basis and our results were in wt.w. However, our results indicate that some trace elements other than Cu (mainly Co, Mn and Zn) are increased in the liver of dogs affected by CH. Taking into account that multi-element analysis by ICP-MS is nowadays relatively cheap, easily-available and requires minimal sample size, the determination of main trace elements in the liver as well as their interactions could help to better understand the disease and enhance diagnosis of liver disease in dogs.

Acknowledgements

The authors are grateful to the veterinary professionals for sending us samples. We would also like to thank Lucia Casanova Iglesias for technical assistance. This paper has been corrected by a native speaker from the UK, Alec Butcher, whom the USC has on retainer.

Conflict of interest

None of the authors have any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

References

- Aschner, J. L. & Aschner, M. (2005) Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine* **26**, 353-362
- Bexfield, N. H., Buxton, R. J., Vicek, T. J., *et al.* (2012) Breed, age and gender distribution of dogs with chronic hepatitis in the United Kingdom. *Veterinary Journal* **193**, 124-128
- Bowman, A. B., Kwakye, G. F., Herrero Hernández, E., *et al.* (2011) Role of manganese in neurodegenerative diseases. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **25**, 191-203
- Center, S. A. (1999) Chronic liver disease: current concepts of disease mechanisms. *Journal of Small Animal Practice* **40**, 106-114
- Fieten, H., Dirksen, K., van den Ingh, T. S., *et al.* (2013) D-penicillamine treatment of copper-associated hepatitis in Labrador retrievers. *Veterinary Journal* **196**, 522-527
- Fieten, H., Biourge, V. C., Watson, A. L., *et al.* (2014) Nutritional management of inherited copper-associated hepatitis in the Labrador retriever. *Veterinary Journal* **199**, 429-433
- Fuentealba, I. C. & Aburto, E. M. (2003) Animal models of copper-associated liver disease. *Comparative Hepatology* **2**, 5
- Gow, A. G., Frowde, P. E., Elwood, C. M., *et al.* (2015) Surgical attenuation of spontaneous congenital portosystemic shunts in dogs resolves hepatic encephalopathy but not hypermanganesemia. *Metabolic Brain Disease* **30**, 1285-1289
- Haywood, S., Rutgers, H. C. & Christian, M. K. (1988) Hepatitis and copper accumulation in Skye terriers. *Veterinary Pathology* **25**, 408-414
- Hoffmann, G., van den Ingh, T. S., Bode, P., *et al.* (2006) Copper-associated chronic hepatitis in Labrador Retrievers. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **20**, 856-861
- Hoffmann, G., Jones, P. G., Biourge, V., *et al.* (2009) Dietary management of hepatic copper accumulation in Labrador retrievers. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **23**, 957-963
- Howell, J. M. C. & Gooneratne, R. (1987) The pathology of copper toxicity in animals. In: *Copper in Animals and Man*, Vol. II. Eds J. M. C. Howell and J. M. Gawthorne. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp 53-78
- Johnston, A., Center, S., McDonough, S., *et al.* (2013) Hepatic copper concentrations in Labrador retrievers with and without chronic hepatitis: 72 cases (1980-2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **242**, 372-380
- Kilpatrick, S., Jacinto, A., Foale, R. D., *et al.* (2014) Whole blood manganese concentrations in dogs with primary hepatitis. *Journal of Small Animal Practice* **55**, 241-246
- López-Alonso, M. L., Benedito, J. L., Miranda, M., *et al.* (2002) Interactions between toxic and essential trace metals in cattle from a region with low levels of pollution. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **42**, 165-172
- Mandigers, P. J. J., van den Ingh, T. S., Bode, P., *et al.* (2004) Association between liver copper concentration and subclinical hepatitis in Doberman Pinschers. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **18**, 647-650
- Mercer, J. F. B. (2001) The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends in Molecular Medicine* **7**, 64-69
- Poldervaart, J. H., Favier, R. P., Penning, L. C., *et al.* (2009) Primary hepatitis in dogs: a retrospective review (2002-2006). *Journal of Veterinary Internal Medicine* **23**, 72-80
- Pressler, B. M., Moore, G. E. & Favier, R. P. (2010) Hepatic and biliary trace element concentrations in healthy dogs versus dogs with hepatopathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **24**, 757
- Puls, R. (1994) Mineral Levels in Animal Health. 2nd edn. Sherpa International, Clearbrook, BC, Canada
- Rifkin, J. & Miller, M. (2014) Copper-associated hepatitis in a Pembroke Welsh corgi. *Canadian Veterinary Journal* **55**, 573-576
- Rothuizen, J. & Twedt, D. C. (2009) Liver biopsy techniques. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **39**, 469-480
- Rothuizen, J., Bunch, S. E., Charles, J. A., *et al.* (2006) WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Diseases. Saunders Elsevier Ltd, Philadelphia, PA, USA
- Schultheiss, P. C., Bedwell, C. L., Hamar, D. W., *et al.* (2002) Canine liver iron, copper, and zinc concentrations and association with histologic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **14**, 396-402
- Simonsen, L. O., Harbak, H. & Bennekou, P. (2012) Cobalt metabolism and toxicology: a brief update. *The Science of the Total Environment* **432**, 210-215
- Smedley, R., Mullaney, T. & Rumble, W. (2009) Copper-associated hepatitis in Labrador retrievers. *Veterinary Pathology* **46**, 484-490
- Soubasis, N., Rallis, T. S., Vlemmas, J., *et al.* (2006) Serum and liver iron concentration in dogs with experimentally induced hepatopathy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **21**, 599-604
- Thornburg, L. P. (2000) A perspective on copper and liver disease in the dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **12**, 101-110
- Thornburg, L. P., Shaw, D., Dolan, M., *et al.* (1986) Hereditary copper toxicosis in West Highland white terriers. *Veterinary Pathology* **23**, 148-154
- Thornburg, L. P., Rottinghaus, G., McGowan, M., *et al.* (1990) Hepatic copper concentrations in purebred and mixed-breed dogs. *Veterinary Pathology* **27**, 81-88
- Tuschl, K., Mills, P. B. & Clayton, P. T. (2013) Manganese and the brain. *International Review of Neurobiology* **110**, 277-312
- Van De Sluis, B., Rothuizen, J., Pearson, P. L., *et al.* (2002) Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Human Molecular Genetics* **11**, 165-173
- Watson, P. J. (2004) Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of the aetiology, progression, and treatment. *Veterinary Journal* **167**, 228-241
- Webb, C. & Twedt, D. (2008) Oxidative stress and liver disease. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* **38**, 125-135
- Webb, C. B., Twedt, D. C. & Meyer, D. J. (2002) Copper-associated liver disease in Dalmatians: a review of 10 dogs (1998-2001). *Journal of Veterinary Internal Medicine* **16**, 665-668
- Zheng, W., Fu, S. X., Dydak, U., *et al.* (2011) Biomarkers of manganese intoxication. *NeuroToxicology* **32**, 1-8

